



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DAYARA VIRGÍNIA LINO ÁVILA**

**Desenvolvimento de estratégias analíticas visando a  
determinação de macroelementos, microelementos e  
elementos traço em rações de cães e gatos empregando  
técnicas de espectrometria atômica**

**Development of analytical strategies aiming the  
determination of macroelementos, microelementos and trace  
elements in feeds for dogs and cats employing atomic  
spectrometry techniques**





**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**  
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DAYARA VIRGÍNIA LINO ÁVILA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Sergipe, para a obtenção do título de Mestre em Química.

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Elisangela de Andrade Passos (UFS)**

**Coorientador: Prof. Dr. Rennan Geovanny Oliveira Araujo (UFBA)**

*Master Dissertation presented to the Graduate Program in Chemistry of the Federal University of Sergipe to obtain MSc. in Chemistry.*



**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

Ávila, Dayara Virgínia Lino  
A958d      Desenvolvimento de estratégias analíticas visando a  
determinação de macroelementos, microelementos e elementos  
traço em rações de cães e gatos empregando técnicas de  
espectrometria atômica / Dayara Virgínia Lino Ávila ; orientador  
Elisangela de Andrade Passos. - São Cristóvão, 2016.  
124 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de  
Sergipe, 2016.

1. Animais domésticos - Alimentos e rações. 2. Planejamento  
experimental. 3. Elementos traços. 4. Espectrometria. I. Passos,  
Elisangela de Andrade, Orient. II. Título.

CDU 543.621



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SERGIPE

Programa de Pós-graduação em  
Química - PPGQ



## FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação  
de Mestrado de Dayara Virgínia Lino Ávila  
apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Química da Universidade Federal de Sergipe em  
29/02/2016.

*Elisangela de Andrade Passos*

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Elisangela de Andrade Passos  
Departamento de Química-UFS

*Rennan Geovanny Oliveira Araujo*

Prof. Dr. Rennan Geovanny Oliveira Araujo  
Departamento de Química Analítica- UFBA

*Luciane Pimenta Cruz Romão*

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Luciane Pimenta Cruz Romão  
Departamento de Química - UFS

*Tatiane de Andrade Maranhão*

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tatiane de Andrade Maranhão  
Departamento de Química - UFSC

*Aos meus amados pais, Iara e Adenilson, por todo amor, dedicação, incentivo e confiança, aos meus irmãos Dênisson (in memorian) e Danilo, e ao meu namorado Sidnei.*

*Dedico.*

*“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”*

*(José de Alencar)*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, pelo Dom da vida, por me dar forças, coragem e por ser meu refúgio e fortaleza nas horas mais difíceis, ajudando-me a não desistir e seguir sempre firme. Sem tua proteção e cuidado Senhor, eu não chegaria a lugar nenhum.

Aos meus pais Adenilson e Iara por todos os ensinamentos, esforço, dedicação, apoio, amor, exemplos de vida e por acreditarem em mim sempre, me incentivando a perseguir objetivos cada vez maiores. Aos meus irmãos, Dênisson (*in memoriam*) e Danilo por toda torcida, amor e todo apoio. Amo vocês incondicionalmente.

Ao meu namorado Sidnei, por toda ajuda e por todo apoio concedido durante todo o tempo que precisei.

À minha orientadora Prof. Dr<sup>a</sup> Elisangela de Andrade Passos, pela confiança, amizade, disponibilidade, ajuda e por todo acompanhamento no decorrer do meu mestrado.

Ao meu coorientador e amigo Prof. Dr. Rennan Geovanny Oliveira Araujo, pela paciência, dedicação, incentivo, confiança e apoio tanto na graduação como no mestrado.

Ao Prof Dr. Carlos Alexandre Borges Garcia, por ceder o espaço no Laboratório de Química Ambiental (LQA) para a realização e acomodação dos experimentos, como também para a minha permanência lá por todos esses anos de graduação e mestrado.

Ao Prof Dr. José do Patrocínio Hora Alves, pelo acesso à infraestrutura do Instituto Tecnológico e de Pesquisas do Estado de Sergipe (ITPS) para a realização das análises no ICP OES.

À Prof. Dr<sup>a</sup> Maria Goreti Rodrigues Vale, à Dr<sup>a</sup> Aline Rocha Borges e ao Dr. Álvaro Tavares Duarte, pela parceria, ajuda e apoio na realização do

trabalho no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

A todos os amigos do LQA e agregados: Humberto, Silvânio, Kelly, Ailton, Erivaldo, Carlos Henrique, André Coelho, Márcio, André, Raquel, Ana Carla, Felipe, Joelington e Clóvis.

Aos irmãos científicos: Jeferson, Samir, Felipo, Silvânio, Vaniele, Humberto e Erivaldo.

Aos meus amigos e colegas: Mônica, Schinaider, Juciara, Ingrid, Alex, Ruyanne, Danilo, Oséas, Vanessa, Rosana, Daniela, Cristiane, Viviane e Jeissy pela companhia, descontração e muitas risadas, tornando todos estes anos de estudos muito mais alegres.

Ao Prof Dr. Jean Marcel Oliveira Araujo pela disponibilidade e colaboração no trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFS.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas do Ensino Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional para Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro para a realização do trabalho através das bolsas (processo CNPq nº 312058/2012-8), (processo CNPq nº 482416/2013-0), e o auxílio à pesquisa (processo CNPq nº 482416/2013-0).

Enfim, a todos que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, e que torceram para que eu chegasse a este momento, o de me tornar Mestre em Química!!

Muito Obrigada.



## **PRODUÇÃO CIENTÍFICA GERADA DURANTE O MESTRADO**

### **TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS**

ÁVILA, D.V.L.; SOUZA, S.O.; COSTA, S.S.L.; SANTOS, M.S.; GARCIA, C.A.B.; ALVES, J.P.H.; ARAUJO, R.G.O.; Otimização multivariada de método analítico para a determinação de Cu, Mn e Zn em ração animal empregando amostragem em suspensão por FS FAAS. **V Workshop de Quimiometria, 2014, Arembepe, Bahia, Brasil.**

ÁVILA, D. V. L.; SOUZA, S. O.; COSTA, S. S. L.; GARCIA, C. A. B.; ALVES, J. P. H.; PASSOS, E. A.; ARAUJO, R. G. O.; Multivariate optimization of the digestion conditions of cat and dog wet feeds. **VIII Congreso Argentino de Química Analítica, 2015, La Plata, Argentina.**

ÁVILA, D. V. L.; ARAUJO, R. G. O.; SOUZA, S. O.; COSTA, S. S. L.; GARCIA, C. A. B.; PASSOS, E. A.; Determination of zinc in dry feeds for cats and dogs by energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry: na alternative for direct solid simple analysis. **VIII Congreso Argentino de Química Analítica, 2015, La Plata, Argentina.**

ÁVILA, D. V. L.; ARAUJO, R. G. O.; SOUZA, S. O.; COSTA, S. S. L.; GARCIA, C. A. B.; PASSOS, E. A.; Determinação de zinco em rações de cães e gatos empregando espectrometria de fluorescência de Raios-X com energia dispersiva. **IV Congresso Analítica Latin America, 2015, São Paulo, Brasil.**

ÁVILA, D. V. L.; SOUZA, S. O.; COSTA, S. S. L.; GARCIA, C. A. B.; ALVES, J. P. H.; PASSOS, E. A.; ARAUJO, R. G. O.; Otimização multivariada das condições para digestão de rações úmidas de animais de estimação em bloco digestor em sistema fechado usando reagentes diluídos. **VI Workshop de Quimiometria, 2015, Ilhéus, Bahia, Brasil.**

## **MANUSCRITOS A SEREM ELABORADOS**

ÁVILA, D. V. L.; SOUZA, S. O.; COSTA, S. S. L.; GARCIA, C. A. B.; ARAUJO, R. G. O.; PASSOS, E. A.; Determination of zinc in dry feeds for cats and dogs by energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry: an alternative for direct solid sampling analysis. **Submetido**

ÁVILA, D.V.L.; VALE, M.G.R.; BORGES, A.R.; ARAUJO, R.G.O.A.; PASSOS, E.A. Determination of Co and Cr on feed wet dogs and cats using direct solid sampling and detection by high resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. **Manuscrito sendo redigido**

ÁVILA, D. V. L.; SOUZA, S. O.; COSTA, S. S. L.; GARCIA, C. A. B.; ALVES, J. P. H.; ARAUJO, R. G. O.; PASSOS, E. A.; Multivariate optimization of the digestion conditions of wet feeds for cats and dogs. **Submetido**

## SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

RESUMO

ABSTRACT

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>   | <b>23</b> |
| 1.1. Alimentação destinada aos cães e gatos.....   | 25        |
| 1.2. Tipos de rações destinadas aos animais de estimação .....   | 28        |
| 1.3. Composição mineral em rações de animais de estimação .....  | 29        |
| 1.4. Controle de qualidade para rações de animais de estimação .....   | 31        |
| 1.5. Preparo de amostra.....   | 32        |
| 1.5.1. Digestão via seca.....  | 33        |
| 1.5.2. Digestão via úmida em sistemas aberto ou fechado com aquecimento<br>convencional ou por micro-ondas ..... | 34        |
| 1.5.3. Análise direta de sólidos.....  | 37        |
| 1.6. Técnicas de espectrometria atômica para análises químicas .....   | 39        |
| 1.7. Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente.....                                     | 42        |
| 1.8. Espectrometria de absorção atômica com fonte contínua de alta resolução e<br>forno de grafite .....         | 45        |
| 1.9. Espectrometria de Fluorescência de Raios-X por Energia Dispersiva .....                                     | 50        |
| <b>2. OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA ANÁLISE DE RAÇÕES ÚMIDAS<br/>DE CÃES E GATOS POR ICP OES .....</b>     | <b>53</b> |
| 2.1. Objetivo geral .....  | 53        |
| 2.2. Objetivos específicos.....  | 53        |
| 2.3. Precauções com a manipulação e descarte das soluções.....   | 53        |
| 2.4. Amostragem .....  | 54        |
| 2.5. Materiais e reagentes .....   | 54        |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.6. Controle de qualidade e amostras de rações úmidas de cães e gatos .....   | 54        |
| 2.7. Preparo das amostras .....  | 55        |
| 2.8. Digestão em bloco digestor em sistema fechado.....  | 55        |
| 2.9. Instrumentação.....   | 56        |
| 2.10. Análise dos dados .....  | 57        |
| 2.11. Resultados e Discussão .....   | 58        |
| 2.11.1. <i>Otimização das condições de digestão das amostras no bloco digestor em sistema fechado a partir de um planejamento fatorial em dois níveis.....</i> | 58        |
| 2.12. Caracterização dos parâmetros analíticos do método .....   | 66        |
| 2.12.1. <i>Parâmetros analíticos do método otimizado .....</i>   | 66        |
| 2.12.2. <i>Aplicação do método otimizado em rações úmidas para cães e gatos .....</i>  | 73        |
| <b>3. CONCLUSÃO .....</b>  | <b>80</b> |
| <b>4. DETERMINAÇÃO DE CROMO E COBALTO EM AMOSTRAS DE RAÇÕES ÚMIDAS PARA CÃES E GATOS USANDO ANÁLISE DIRETA DE SÓLIDOS E DETECÇÃO POR HR-CS GF AAS. ....</b>    | <b>82</b> |
| 4.1. OBJETIVOS .....   | 82        |
| 4.1.1. <i>Objetivo geral .....</i>   | 82        |
| 4.1.2. <i>Objetivos específicos.....</i>   | 82        |
| 4.2. Parte experimental .....  | 82        |
| 4.2.1. <i>Reagentes e Soluções .....</i>   | 82        |
| 4.2.2. <i>Preparo das amostras de rações úmidas .....</i>  | 83        |
| 4.3. Instrumentação.....   | 84        |
| 4.4. Controle de qualidade .....   | 86        |
| <b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>   | <b>86</b> |
| 5.1. Estudo da massa de amostra .....  | 86        |
| 5.1.1. <i>Cromo .....</i>  | 86        |
| 5.1.2. <i>Cobalto.....</i>   | 87        |
| 5.2. Otimização da temperatura de pirólise .....   | 88        |
| 5.3. Otimização da temperatura de atomização .....   | 90        |

|   |            |
|---|------------|
| 5.3.1. Cromo .....  | 90         |
| 5.3.2. Cobalto.....   | 91         |
| 5.4. Parâmetros de mérito .....   | 93         |
| 5.4.1. Precisão e exatidão .....  | 96         |
| 5.5. Aplicação dos métodos .....  | 99         |
| <b>6. CONCLUSÃO .....</b>   | <b>102</b> |
| <b>7. DETERMINAÇÃO DE Zn EM RAÇÕES SECAS DE CÃES E GATOS USANDO A ESPECTROMETRIA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X POR ENERGIA DISPERSIVA. ....</b> | <b>103</b> |
| 7.1. OBJETIVOS .....  | 103        |
| 7.1.1. Objetivo Geral .....   | 103        |
| 7.1.2. Objetivos Específicos .....  | 103        |
| 7.2. PARTE EXPERIMENTAL .....   | 103        |
| 7.2.1. Materiais e métodos .....  | 103        |
| 7.2.2. Preparo das pastilhas.....   | 104        |
| 7.2.3. Quantificação de zinco em amostras de rações de animais de estimação .   | 104        |
| <b>8. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>  | <b>105</b> |
| 8.1. Validação do método proposto .....   | 105        |
| 8.2. Limite de detecção, limite de quantificação e linearidade. ....  | 105        |
| 8.3. Exatidão .....   | 106        |
| 8.4. Precisão .....   | 108        |
| <b>9. CONCLUSÃO .....</b>   | <b>110</b> |
| <b>10. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>  | <b>110</b> |
| <b>11. PERSPECTIVAS PARA O TRABALHO.....</b>  | <b>111</b> |
| <b>12. REFERÊNCIAS .....</b>  | <b>112</b> |

## LISTA DE FIGURAS

|   |       |
|---|-------|
| <b>Figura 1.</b> Consumo de ração por espécie no ano 2010.....  | 27    |
| <b>Figura 2.</b> Receita anual em bilhões de dólares no mercado pet mundial.....  | 28    |
| <b>Figura 3.</b> Esquema de um forno de micro-ondas.....  | 36    |
| <b>Figura 4.</b> Esquema da geração do plasma para ICP OES.....   | 42    |
| <b>Figura 5.</b> Equipamento de HR-CS GF AAS- modelo ContrAA 700 da Analytik Jena...  | 47    |
| <b>Figura 6.</b> Plataforma de grafite pirolítico utilizada em HR-CS GF AAS.....  | 47    |
| <b>Figura 7.</b> Forno de grafite utilizado em HR-CS GF AAS.....  | 47    |
| <b>Figura 8.</b> Pinça do amostrador manual.....  | 48    |
| <b>Figura 9.</b> Espectrômetro de fluorescência de raios X com energia dispersiva.....  | 51    |
| <b>Figura 10.</b> Gráfico de Pareto do planejamento fatorial $2^4$ com triplicata do ponto central usando a concentração de $\text{HNO}_3$ e $\text{H}_2\text{O}_2$ , tempo e temperatura como variáveis independentes..... | 62    |
| <b>Figura 11.</b> Gráfico em cubo do planejamento fatorial $2^4$ com três pontos centrais para o $\text{HNO}_3$ , $\text{H}_2\text{O}_2$ e temperatura.....   | 63    |
| <b>Figura 12.</b> Gráfico em cubo do planejamento fatorial $2^4$ com três pontos centrais para o $\text{HNO}_3$ , $\text{H}_2\text{O}_2$ e tempo.....   | 64    |
| <b>Figura 13.</b> Gráfico em cubo do planejamento fatorial $2^4$ com três pontos centrais para a temperatura, tempo e $\text{H}_2\text{O}_2$ .....  | 65    |
| <b>Figura 14.</b> Valores de média, mínimo e máximos em rações para cães. (A) Concentração dos macronutrientes (B) e (C) Concentração dos micronutrientes e elementos traço.....  | 78/79 |
| <b>Figura 15.</b> Valores de média, mínimo e máximos em rações para gatos. (A) Concentração dos macronutrientes (B) e (C) Concentração dos micronutrientes e elementos traço. ....  | 80/81 |
| <b>Figura 16.</b> Estudo de massa de amostra para Cr. $T_{\text{pir}}: 1500^\circ\text{C}$ e $T_{\text{atm}}: 2500^\circ\text{C}$ .....   | 88    |

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 17.</b> Estudo de massa de amostra para Co. $T_{\text{pir}}$ : 1400°C e $T_{\text{atm}}$ : 2400 °C.....   | 88 |
| <b>Figura 18.</b> Curvas de pirólise; (-●-) 60 pg de Cr e (-□-) 0,250 mg de amostra de ração de gato, a uma temperatura de atomização de 2500°C.....  | 90 |
| <b>Figura 19.</b> Curvas de pirólise; (-●-) 80 pg de Co e (-□-) 0,030 mg de amostra de ração de gato, a uma temperatura de atomização de 2400 °C.....   | 90 |
| <b>Figura 20.</b> Curvas de atomização de (-●-) 60 pg de Cr e (-□-) 0,250 mg de amostra de ração de gato a uma temperatura de pirólise de 1500°C e atomização de 2500°C....   | 91 |
| <b>Figura 21.</b> Espectro de absorção resolvido temporalmente na vizinhança da linha analítica de Cr em 357,8687 nm: (A) massa de 60 pg de Cr e (B) 0,250 mg de amostra de ração. Temperatura de pirólise de 1500 °C e de atomização de 2500 °C:.....                                | 92 |
| <b>Figura 22.</b> Curvas de atomização de (-●-) 80 pg de Co e (-□-) 0,030 mg de amostra de ração de gato. Temperatura de pirólise de 1400°C e de atomização de 2400 °C.....   | 93 |
| <b>Figura 23.</b> Espectro de absorção de cobalto em 240,7254 nm resolvido temporalmente na vizinhança da linha analítica: (A) massa de 80 pg de Co e (B) massa de 0,030 mg da amostra de ração úmida liofilizada. Temperatura de pirólise de 1400 °C e de atomização de 2400 °C..... | 94 |

## LISTAS DAS TABELAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1.</b> Trabalhos relatados na literatura usando técnicas de espectrometria atômica.....  | 41 |
| <b>Tabela 2.</b> Características e condições operacionais utilizadas no ICP OES com vista axial para a determinação simultânea de macroelementos, microelementos e elementos traço em ração de cães e gatos úmida.....                               | 57 |
| <b>Tabela 3.</b> Matriz do Planejamento fatorial $2^4$ com três pontos centrais, com os níveis codificados e valores reais para as variáveis e os valores de carbono residual como resposta.....   | 60 |
| <b>Tabela 4.</b> Valores de concentração e porcentagem dadas da acidez residual para os experimentos do planejamento fatorial.....   | 67 |
| <b>Tabela 5.</b> Valores de concentração equivalente ao sinal de fundo, limite de detecção e limite de quantificação obtidos para análise das amostras de rações úmidas destinadas a cães e gatos.....   | 72 |
| <b>Tabela 6.</b> Valores do teste de adição e recuperação para os macroelementos, microelementos e elementos traços determinados em ração úmida de cães e gatos com digestão em sistema fechado no bloco digestor.....                               | 73 |
| <b>Tabela 7.</b> Valores certificados, valores encontrados e o percentual das concordâncias para as análises dos materiais de referência certificados por ICP OES, usando como método de abertura de amostra a digestão úmida no bloco digestor..... | 74 |
| <b>Tabela 8.</b> Concentrações dos elementos B, Ba, Ca, Fe, K, Mg, Mn, P, Sr e Zn em amostras úmidas de ração de cães e gatos, por ICP OES, usando como método de abertura de amostra a digestão úmida no bloco digestor em sistema fechado.....     | 76 |
| <b>Tabela 9.</b> Resumo estatístico das concentrações dos elementos nas amostras de rações de cães.....  | 78 |
| <b>Tabela 10.</b> Resumo estatístico das concentrações dos elementos nas amostras de rações de gatos.....  | 80 |
| <b>Tabela 11.</b> Programa de temperatura utilizado para a determinação de cromo em amostras de ração úmida para cães e gatos.....   | 86 |



|  |     |
|--|-----|
| <b>Tabela 12.</b> Programa de temperatura utilizado para a determinação de cobalto em amostras de ração úmida para cães e gatos.....   | 86  |
| <b>Tabela 13.</b> Parâmetros de mérito na determinação de Cr e Co em rações de cães e gatos por HR-CS SS-GF AAS.....   | 96  |
| <b>Tabela 14.</b> Valores de LoD encontrados por diferentes técnicas na determinação de Cr e Co em ração animal.....   | 97  |
| <b>Tabela 15.</b> Resultados da determinação de cromo e cobalto nos materiais de referência certificados por HR-CS SS-GF AAS e o teste t aplicado.....   | 98  |
| <b>Tabela 16.</b> Resultados das concentrações obtidas para Cr e Co em amostras de ração úmida empregando os métodos propostos.....  | 101 |
| <b>Tabela 17.</b> Parâmetros de mérito do método analítico para determinação de zinco em amostras de animais de estimação por EDXRF.....   | 107 |
| <b>Tabela 18.</b> Resultados obtidos para as concentrações de Zn usando o método analítico por EDXRF, comparados com os resultados obtidos através do método analítico utilizando ICP OES em rações de cães e gatos..... | 108 |
| <b>Tabela 19.</b> Resultados da ANOVA.....   | 108 |
| <b>Tabela 20.</b> Valores de concentrações média, máximo, mínimo, desvio padrão relativo e desvio padrão relativo intermediário, obtidos para as determinações de Zn por EDXRF.....                                      | 110 |

## LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

AAFCO – Associação Americana de Controle Oficial de Alimentos (do inglês: *Association American Feed Control Officials*).

AAS – Espectrometria de absorção atômica (do inglês: *Atomic absorption spectrometry*).

ANOVA – Análise da variância (do inglês: *Analysis of variance*).

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

BEC – Concentração equivalente ao sinal de fundo (do inglês: *Background equivalent concentration*).

CCD – Dispositivo de carga acoplada (do inglês: *Charge coupled device*).

CP – Pixel central (do inglês: *Center pixel*).

CRM – Material de referência certificado (do inglês: *Certified reference material*).

CV AAS – Espectrometria de absorção atômica com vapor frio (do inglês: *Cold vapor atomic absorption spectrometry*).

EDXRF – Espectrometria de fluorescência de raios X por energia dispersiva (do inglês: *Energy dispersive X-ray fluorescence*).

FAAS – Espectrometria de absorção atômica com chama (do inglês: *Flame atomic absorption spectrometry*).

GF AAS – Espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (do inglês: *Graphite furnace atomic absorption spectrometry*).

HR-CS AAS - Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (do inglês: *High resolution continuum source atomic absorption spectrometry*).

HR-CS GF AAS – Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite (do inglês: *High resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry*).

ICP-MS – Espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (do inglês: *Inductively coupled plasma mass spectrometry*).

ICP OES – Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (do inglês: *Inductively coupled plasma optical emission spectrometry*).

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial.

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada (do inglês: *International Union of Pure and Applied Chemistry*).

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

MPA – Material particulado atmosférico (do inglês: *Airborne Particulate Matter*).

NIST – Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (do inglês: *National Institute of Standards and Technology*).

NRC – Conselho Nacional de Pesquisa (do inglês: *National Research Council*).

PTFE – Politetrafluoretileno.

PVSA – Absorvância do volume do pico selecionado (do inglês: *Peak volume selected absorbance*).

SBR – Razão sinal/ ruído (do inglês: *Signal-to-background ratio*).

SS – Amostragem direta de sólidos (do inglês: *solid sampling*).

HR-CS SS-GF AAS – Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite e amostragem direta de sólidos (do inglês: *Solid sampling high resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry*).

## RESUMO

Neste trabalho, foram desenvolvidos quatro métodos para análise de rações de cães e gatos, usando técnicas de espectrometria atômica. Primeiramente, foi empregada a otimização multivariada do procedimento de digestão da amostra para determinação simultânea de macroelementos (Ca, K, Mg e P), microelementos (Cu, Fe, Mn e Zn) e elementos traço (Al, B, Ba e Sr) em rações úmidas de cães e gatos, utilizando a espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES). Os resultados das concentrações dos elementos nas rações dos animais mostraram-se de acordo com os valores fornecidos e regulamentados pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e pela Associação Americana de Controle Oficial dos Alimentos (AAFCO). Os LoD's variaram entre  $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$  (Ba, Mg e Sr) e  $15,0 \mu\text{g g}^{-1}$  (P) e os LoQ's variaram entre  $0,3 \mu\text{g g}^{-1}$  (Ba, Mg e Sr) e  $49,9 \mu\text{g g}^{-1}$  (P). Na segunda parte do trabalho, foram otimizados dois métodos analíticos para determinação de Co e Cr em rações úmidas (sachês e enlatadas) para cães e gatos utilizando análise direta de sólidos (SS) e detecção por espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e atomização em forno de grafite (HR-CS GF AAS). Foram estabelecidas temperaturas de pirólise de  $1500^{\circ}\text{C}$  e de  $1400^{\circ}\text{C}$  para a determinação de Cr e Co respectivamente, e temperaturas de atomização de  $2500^{\circ}\text{C}$  para Cr e de  $2400^{\circ}\text{C}$  para Co, sem o uso de modificadores químicos. Os métodos otimizados foram rápidos, precisos e exatos, além de contribuir com a concepção da Química Verde. Os resultados obtidos para as concentrações de Cr e Co não foram comparados com nenhuma norma, uma vez que estes elementos não são regulamentados. Os LoD's obtidos para Cr e Co foram de  $0,01$  e  $0,05 \mu\text{g g}^{-1}$  respectivamente, já os LoQ's obtidos para Cr e Co foram de  $0,03$  a  $0,17 \mu\text{g g}^{-1}$  respectivamente. Por fim, na terceira parte do trabalho, foi desenvolvido um método analítico para determinação de Zn em rações secas destinadas à alimentação de cães e gatos empregando a espectrometria de fluorescência de raios-X com energia dispersiva (EDXRF). As amostras foram preparadas na forma de pastilhas

prensadas e a concentração de Zn, determinada em sete rações secas de cães e gatos. Os resultados obtidos foram estatisticamente comparados com os valores encontrados através de um método analítico estabelecido por ICP OES, em que foi aplicado o teste t pareado entre as concentrações de Zn por EDXRF e ICP OES. Os LoD e LoQ obtidos na determinação de Zn através do método foram de 0,1 e 0,4 mg kg<sup>-1</sup> respectivamente. Os métodos independentes não apresentaram diferença significativa para um nível de confiança de 95%. Em nosso trabalho, os métodos analíticos propostos foram eficientes, rápidos, e confiáveis para a determinação de macroelementos (Ca, Mg, K e P), microelementos (Cu, Fe, Mn e Zn) e elementos traço (Al, B, Ba, Co, Cr e Sr) em rações de cães e gatos, usando técnicas espectroanalíticas. Este trabalho teve o auxílio financeiro do projeto Universal Edital 014/2013 aprovado pelo CNPq, registrado sob processo nº 482416/2013-0.

**Palavras-chave:** Rações de animais de estimação; Constituintes inorgânicos; Preparo de amostra; HR-CS GF AAS; EDXRF; ICP OES; Planejamento de experimentos.

## **ABSTRACT**

In this work, four methods were developed for analysis of feed for dogs and cats using atomic spectrometry techniques. Initially, the multivariate optimization of sample digestion procedure was employed in wet feed for dogs and cats and then the simultaneous determination of macroelements (Ca, K, Mg and P), microelements (Cu, Fe, Mn, and Zn) and trace elements (Al, B, Ba and Sr) was carried out by optical emission spectrometry with inductively coupled plasma (ICP OES). The results of the elements concentrations in the samples were in agreement with the values provided and regulated by Ministry of Agriculture, Livestock and Supply (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA) and American Association of Official Food Control Officials (AAFCO). Limits of detections (LoD) ranged between  $0.1 \mu\text{g g}^{-1}$  (Ba, Mg and Sr) and  $15.0 \mu\text{g g}^{-1}$  (P) and limits of quantification (LoQ) between  $0.3 \mu\text{g g}^{-1}$  (Ba, Mg and Sr) and  $49.9 \mu\text{g g}^{-1}$  (P). In the second part of the work two analytical methods were optimized for Co and Cr determination in wet food (sachets and cans) for dogs and cats using direct sample analysis (SS) and detection by high resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry (HR-CS GF AAS). Pyrolysis temperatures were  $1500^\circ\text{C}$  and  $1400^\circ\text{C}$  for Cr and Co determination, respectively. Atomization temperatures of  $2500^\circ\text{C}$  for Cr, and  $2400^\circ\text{C}$  for Co with chemical modifiers were adopted. The optimized method for Co and Cr determination in wet feed was fast, precise and accurate and contributes to the concept of "Green Chemistry". The results obtained for concentrations of Cr and Co were not compared to any official rule, since there is no regulation for these elements. The LoD's obtained for Cr and Co were 0.01 and  $0.05 \mu\text{g g}^{-1}$ , respectively, and LoQ's obtained were 0.03 to  $0.17 \mu\text{g g}^{-1}$  for Cr and Co, respectively. Finally, in the third part of the work, an analytical method for determination of Zn in dry feed for dogs and cats using energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry (EDXRF) was developed. Sample were prepared as pressed pellets. The concentration of Zn in seven dry feed samples for dogs and cats were determinate. The results were statistically compared to the values found by the analytical method by ICP OES. Additionally, paired t-test

between concentrations of Zn by EDXRF and ICP OES was applied. The LoD e LoQ obtained for Zn determination were 0.1 e 0.4 mg kg<sup>-1</sup>, respectively. The independent methods were not significantly different at a 95% confidence level. In our work, the analytical methods proposed were efficient, fast and reliable for the determination of macroelements (Ca, Mg, K and P), microelements (Cu, Fe, Mn and Zn) and trace elements (Al, B, Ba, Co, Cr and Sr) in feeds for dogs and cats using atomic spectrometry techniques. This work was financially supported through the project Universal notice nº 014/2013 approved by CNPq, registered process nº 482416 / 2013-0.

**Keywords:** Feed for pets; Inorganic constituents; Sample preparation; ICP OES; HR-CS GF AAS; EDXFS; Experimental designs.

## 1. INTRODUÇÃO

Cães e gatos são os animais que mais têm apresentado um crescimento nos domicílios de todo o mundo, por consequência, gerando um aumento na produção de alimentos destinados a eles.[1],[2],[3]

As rações para o consumo desses animais têm por obrigação apresentar em sua composição alimentar uma dieta que ofereça os nutrientes fundamentais para que os mesmos possam adquirir uma vida saudável, uma vez que a nutrição animal é um fator indispensável para a sua sustentação.[1],[2],[3]

Inúmeros problemas e doenças dos animais estão relacionados à alimentação. Os cães e gatos particularmente adquirem a obesidade, uma das complicações mais frequentes em suas vidas, ocasionada exclusivamente à má nutrição.[4] Os animais considerados como obesos são aqueles que apresentam peso corporal superior a 10% do seu peso ideal, porém, para cada espécie de animal e raça, existe uma variação desse peso.[4] Essa obesidade atinge cerca de 6-12% dos gatos e 25-45% dos cães, sendo bastante comum em animais com idade mais avançada e castrados, em virtude da redução do gasto energético e alteração hormonal, respectivamente.[4]

Nos últimos anos, a indústria de ração animal tornou-se um mercado que movimenta bilhões de dólares no mundo, sobretudo em países desenvolvidos e em desenvolvimento, os quais fornecem rações locais e importadas.[5] Devido ao crescimento no mercado de produtos para animais de estimação, muitas indústrias têm sido criadas para a fabricação de rações. Além disso, essas indústrias têm investido bastante em rações sofisticadas, produzindo petiscos e alimentos especiais que ajudam no funcionamento do intestino e na higienização dos dentes.[16]

No Brasil, o setor de nutrição para cães e gatos representa 3% da produção total de ração produzida. Em 2012, alcançou 63 milhões de toneladas, uma produção que cresceu aproximadamente 5% e gerou um aumento de 2,3 milhões de toneladas.[19] Este crescimento foi decorrente dos avanços científicos e tecnológicos, que ocasionaram o aprimoramento do



processo de produção em grande escala e na oferta de matérias primas, especialmente, subprodutos de origem animal.[6]

Os alimentos destinados aos cães e gatos apresentam uma variedade de formas e sabores, que incluem rações secas, úmidas, enlatadas, biscoitos e guloseimas, possibilitando aos donos escolher que tipo de produto se adéqua melhor ao seu animal,[2] uma vez que estes produtos são disponibilizados para cada faixa etária, como também para diferentes portes de animais.

O aumento na demanda das rações destinadas aos animais de estimação tornou oportuna a criação de órgãos responsáveis em fiscalizar e classificar esses alimentos. Dentre os órgãos criados, destaca-se a Associação Americana de Controle Oficial de Alimentos (*Association American Feed Control Officials* - AAFCO), que é uma organização privada, constituída por representantes do Estado, Federal e Estrangeiros, criada em 1909 nos Estados Unidos da América (EUA), com a finalidade de contribuir com a uniformidade na alimentação animal. Este órgão define que as rações sejam classificadas em três categorias de acordo com o teor de umidade: aquelas que apresentam valor menor que 20%, entre 20% e 65%, e maior que 65%.[7] Por sua vez, também existe o Conselho Americano, Conselho Nacional de Pesquisa (*National Research Council* - NRC), que classifica as rações apenas como secas e úmidas.[8],[9],[18]

No Brasil, o órgão responsável em fiscalizar e estabelecer os critérios e procedimentos para o registro de estabelecimentos e produtos, para a rotulagem e para a isenção de registro de produtos destinados à alimentação de animais de companhia é o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA).[20]

Apesar de toda a regulamentação por parte dos órgãos responsáveis em fiscalizar e classificar as rações, surge também a preocupação em relação à composição química destes alimentos, pois, além dos elementos essenciais para a nutrição dos animais, há a possibilidade da presença de contaminantes químicos (elementos não essenciais) que podem oferecer riscos à saúde dos cães e gatos.[2],[10]

Os elementos químicos considerados tóxicos para a saúde animal quando em contato com o seu organismo podem provocar diversas implicações.[10] Assim como nos seres humanos, o grau de toxicidade varia de elemento para elemento. Mesmo os essenciais, podem tornar-se potencialmente tóxicos, dependendo do excesso na ingestão. Devido a isto, é oportuno a otimização de métodos analíticos rápidos, precisos e confiáveis para identificar e quantificar estes possíveis elementos, uma vez que a baixa concentração também pode causar danos irreversíveis à saúde dos animais, podendo até levá-los a óbito.

### **1.1. Alimentação destinada aos cães e gatos**

Em 2007, após a morte em massa de animais de companhia nos Estados Unidos da América (EUA), surgiu um grande interesse na análise da composição química e do valor nutricional das rações de animais de estimação,[13] uma vez que os cães e gatos são os mais representativos nos domicílios de todo o mundo.[14]

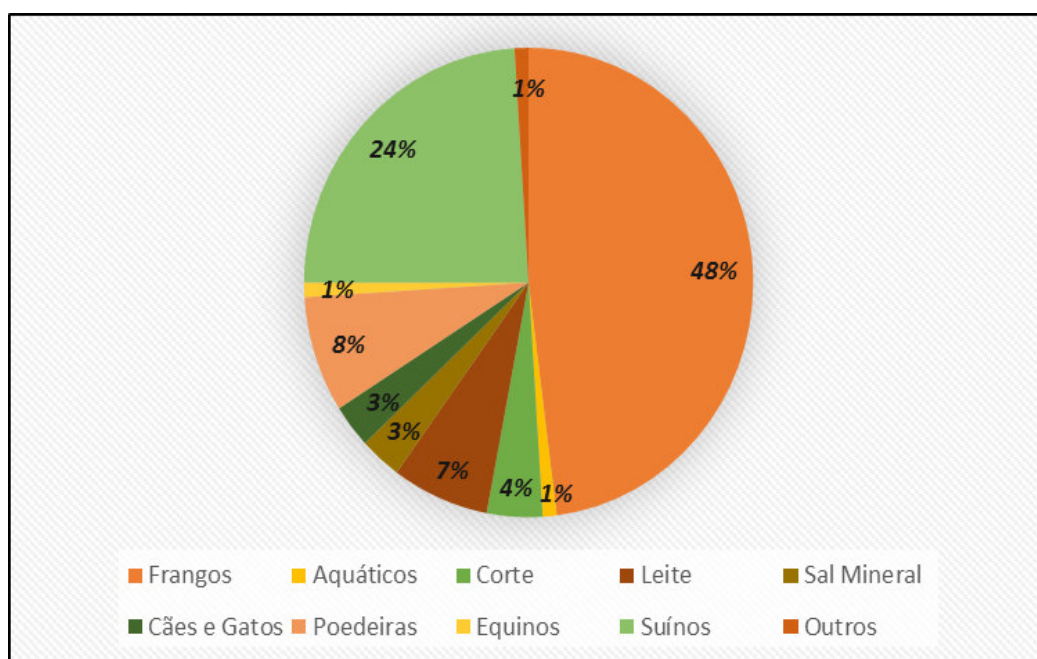
A composição química e classificação ideal das rações destinadas aos animais de estimação passaram a ser fiscalizadas e definidas por agências reguladoras em cada país, como a AAFCO nos EUA e o MAPA no Brasil, as quais visam comercializar rações que apresentem uma nutrição correta e adequada, proporcionando uma vida saudável aos animais de companhia.[14],[15]

Com este intuito, diferentes tipos de rações estão sendo disponibilizadas de acordo com a idade e o estágio de desenvolvimento do animal, uma vez que o conhecimento da composição e da classificação das rações auxilia na prevenção de diversos fatores negativos à saúde dos animais de estimação.[15] Como estes animais são carnívoros, eles apresentam necessidades específicas com relação aos nutrientes, sendo muito seletivos em seus alimentos. Dessa maneira, é um grande desafio para a indústria encontrar um equilíbrio entre a palatabilidade e a qualidade nutricional para a produção destes alimentos.[14]

As rações produzidas para o consumo dos cães e gatos devem ser produtos compostos por ingredientes e/ou matérias-primas destinados exclusivamente à alimentação de animais de estimação, como também produtos sem adulteração e capazes de atender integralmente as exigências nutricionais. A adulteração poderia expor o animal a compostos químicos, ou até mesmo a substâncias proibidas na composição destes alimentos,[18],[31] o que diminuiria o tempo de vida destes animais que são considerados “membros da família”. [20]

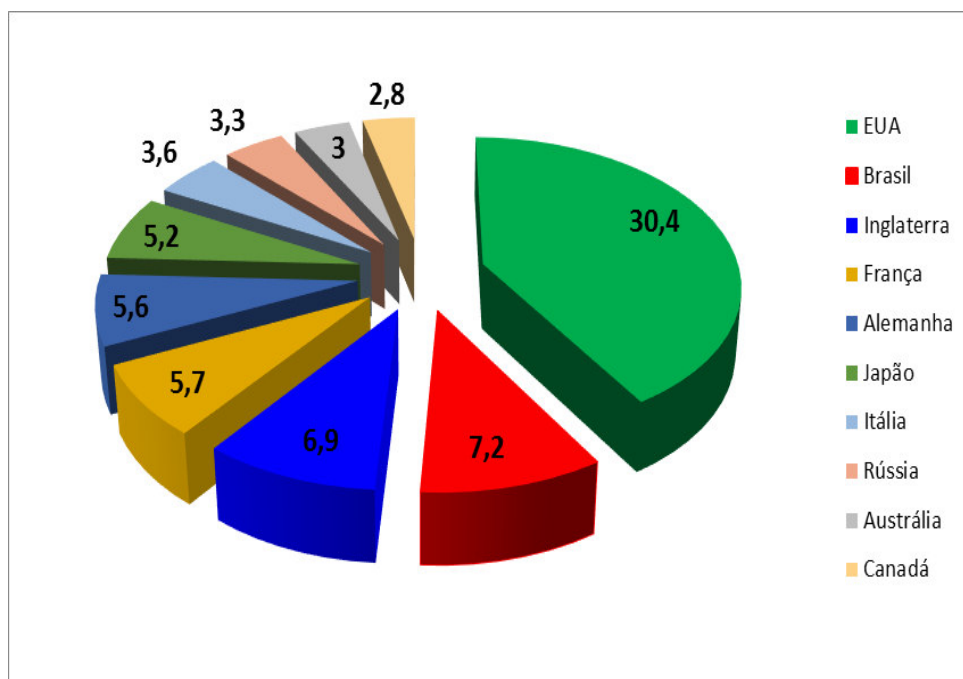
A relação entre os donos e os seus animais de estimação tem crescido bastante nos últimos anos, ocasionando um aumento nas vendas nos setores *pets* de todo o mundo. Isto se deve também à urbanização da população, que passa a viver em ambientes menores e com um menor tempo no seu dia a dia, levando a adotar as rações industrializadas e abandonar o hábito de cozinhar para seu animal.[16]

Na Figura 1 está mostrado o consumo de diversas rações em 2010, em que os alimentos destinados a cães e gatos apresentaram um consumo de 3%, sendo este um valor não significativo em relação as rações para suínos e frangos. No entanto, este tipo de ração vem mostrando a cada ano um aumento na produção e também no consumo, devido ao crescimento na criação dos animais de estimação, como também a preferência dos donos destes animais em alimentá-los com este tipo de produto que fornece uma dieta balanceada.[19]

**Figura 1.** Consumo de ração por espécie no ano de 2010.

**FONTE:** Adaptado de <http://www.agricultura.gov.br> <sup>[19]</sup>

Com o passar dos anos, o mercado *pet* cresceu significativamente em todo o mundo. Em 2014, o Brasil apresentou um crescimento de 8% nesse mercado, no entanto, em 2015 houve uma desaceleração em relação à expansão do valor em 2014, mas, ainda assim, o Brasil segue como o vice-líder no mercado de *pets* global, atrás apenas dos Estados Unidos. Hoje, a ração animal representa cerca de dois terços do segmento *pet*, que movimentou 16,4 bilhões de dólares em 2014, e, no ano de 2015, gastou-se cerca de 7,2 bilhões de dólares, como mostra a Figura 2.[16],[17]

**Figura 2.** Receita anual em bilhões de dólares no mercado *pet* mundial.<sup>[17]</sup>

## 1.2. Tipos de rações destinadas aos animais de estimação

Há uma grande variedade de rações comerciais para animais de estimação, com formulações cada vez mais específicas para cada tipo de animal. Desta forma, essas rações podem ser classificadas em: combate, econômica, padrão, *premium* e *super premium*, de acordo com a qualidade da matéria-prima usada para sua produção.<sup>[3],[6]</sup>

Numa escala de qualidade, as rações *super premium* são fabricadas com ingredientes e materiais de qualidade superior, a partir de proteínas de origem animal, como as bovinas, suínas, de frango ou de peixe. Este tipo de ração é eficiente na dieta dos animais, os quais apresentam uma ótima digestão. Já as rações classificadas como combate utilizam matéria-prima de qualidade inferior, como ossos, vísceras, pés, cabeça, dentre outros subprodutos, sendo este tipo de alimento mal aproveitado no organismo do animal.<sup>[24]</sup>

As rações fornecidas comercialmente e que apresentam em sua composição quantidades corretas dos nutrientes necessários para uma boa

dieta animal, fornecendo uma relação de equilíbrio alimentar, podem ser divididas em: rações secas, semi úmidas ou semi secas, úmidas ou enlatadas e caseira, sendo esta última formulada por um profissional na área de nutrição animal.[23]

As rações classificadas como secas apresentam um teor de umidade que varia entre 6 e 12%, e são denominadas como sólidas ou peletizadas (com diferentes formatos da ração). Por essa razão, estes alimentos proporcionam uma menor palatabilidade ao animal, pois possuem um alto teor calórico e uma baixa digestibilidade, resultando em uma ração de baixa qualidade nutricional. No entanto, é um alimento que possui uma maior durabilidade de conservação, devido a seu menor valor de umidade.[23]

As semi úmidas ou semi secas contêm em média de 15-30% de umidade e apresentam uma maior aceitação por parte dos animais em relação às secas, uma vez que possuem uma consistência macia e um melhor aproveitamento por parte dos animais de estimação.[23]

As rações úmidas em sachês e enlatadas são utilizadas na alimentação diária e também as de maiores indicações por profissionais em nutrição animal, pois possuem um alto teor de umidade, em média 70%, e apresentam em sua composição matéria-prima de origem animal e vegetal, vitaminas e minerais. Estes alimentos são completos, balanceados e de grande aceitação por parte dos animais.[23]

As rações caseiras, formuladas por profissionais da área de nutrição animal, apresentam uma desvantagem em relação às enlatadas e em sachês, como a deficiência em algumas vitaminas, minerais e aminoácidos. Contudo, quando bem formuladas podem proporcionar os mesmos efeitos que as rações industrializadas.[23]

### **1.3. Composição mineral em rações de animais de estimação**

Diversas proteínas, carboidratos, gorduras, vitaminas e minerais são necessários e fundamentais no sustento nutricional, crescimento e também no desempenho corporal dos animais de estimação. Os minerais essenciais para

esses animais podem ser classificados em macromelementos, microelementos e elementos traço, em que todos apresentam uma quantidade necessária na alimentação diária.[25],[26]

Os elementos classificados como macromelementos, tais como cálcio, magnésio, fósforo e potássio, possuem uma necessidade acima de  $100 \text{ mg dia}^{-1}$  na alimentação animal. Já os definidos como microelementos, sendo eles o ferro, zinco, cobre e manganês, são necessários em concentrações de 1 a  $50 \text{ mg dia}^{-1}$ . Os denominados como elementos traço, tais como o cromo, cobalto, alumínio, boro, bário e estrôncio, possuem a necessidade de valores inferiores a  $1 \text{ mg dia}^{-1}$ . [26]

Destes minerais supracitados, o alumínio pode tornar-se potencialmente tóxico quando ingerido no organismo animal. Já o cobalto torna-se provavelmente essencial, assim como o ferro, zinco, manganês e cromo, sendo este último essencial apenas quando presente no estado de oxidação +3, dado que no estado de oxidação +6, esta espécie é tóxica e cancerígena. Os elementos considerados tóxicos mesmo quando ingeridos em baixas concentrações são prejudiciais, e aqueles considerados essenciais quando ingeridos em concentrações elevadas, ou seja, acima do limite diário recomendado, também podem tornar-se prejudiciais e produzem efeitos tóxicos.[12],[27],[29],[30],[31]

O cobalto apresenta a função na vitamina B12 (cianocobalamina), que é sintetizada pelo intestino, sua deficiência provoca apatia, perda de apetite, de peso, fraqueza e anemia.[22]

O cromo, apesar de poucos estudos relacionados à nutrição deste elemento na alimentação dos animais de estimação, quando em quantidades muito baixa no organismo do animal pode provocar pouca tolerância à glicose, afetar o crescimento e o metabolismo de proteínas, como também provocar lesões na córnea. Entretanto, quando presente em quantidades excessivas, torna-se tóxico e pode levar a morte do animal.[22]

O zinco, um microelemento essencial que apresenta uma variedade de funções bioquímicas em todos os organismos vivos, quando presente em

excesso, torna-se tóxico. Este microelemento pode ser encontrado em diversos tipos de alimentos industrializados e produtos de origem animal e vegetal. Sua ingestão inadequada pode causar diversas enfermidades tais como diarreia, perturbações nas funções cerebrais, crescimento retardado e doenças de pele.[2],[10],[11]

No entanto, alguns microelementos, especificamente o ferro e o manganês, são conhecidos por serem essenciais para os animais de companhia, em razão das participações na transmissão de impulsos nervosos, contração muscular e sinalização celular.[25]

Muitos dos elementos químicos presentes em alimentos, sejam eles macroelementos, microelementos ou elementos traço, quando ingeridos em quantidades elevadas podem se acumular no tecido animal, principalmente nos rins, fígado e músculos, acarretando problemas sérios à saúde dos animais.[30]

Dessa forma, como no organismo animal existem quantidades traço de minerais que participam de reações enzimáticas e na alimentação estes minerais podem estar em quantidades altas ou baixas, surge a necessidade de definir a concentração destes elementos nos alimentos destinados aos cães e gatos.[25] Logo, são necessários métodos analíticos confiáveis e rápidos para a determinação dos diferentes níveis de concentrações apresentadas por estes elementos químicos nas rações.

#### **1.4. Controle de qualidade para rações de animais de estimação**

O consumo de alimentos enlatados por animais de estimação é bastante comum em todo o mundo. Esse tipo de alimento é um dos meios que expõe os animais a diversos metais, principalmente os considerados tóxicos, porém, esta exposição não se dá somente pela presença dos metais nos alimentos, mas também pela contaminação no processo de fabricação das embalagens, sobretudo no procedimento de solda que é usado na fabricação das latas em que os alimentos são acondicionados, contaminando-as geralmente com chumbo.[27],[29],[34]



Diante disso, um importante fator a ser avaliado no processo de fabricação de embalagens para o armazenamento dos alimentos é a seleção do material a ser usado, dado que o uso de um material inadequado para o acondicionamento dos alimentos pode originar uma migração de elementos potencialmente tóxicos para os alimentos. Essa migração vai ocorrer por um processo de difusão, que dependerá do gênero alimentício e da temperatura da embalagem durante o tratamento térmico.[35]

Diversos são os materiais que podem ser usados para acondicionar os alimentos, tais como: plástico, papel, metal e vidro.[35] Desta forma, o acondicionamento dos alimentos deve ser fiscalizado por órgãos responsáveis, para que a contaminação dos mesmos por meio das embalagens seja reduzida, oferecendo alimentos seguros para os animais.

Sendo assim, a necessidade de investigar elementos potencialmente tóxicos presentes em rações acondicionadas em embalagens de sachês e enlatados torna-se fundamental.

### **1.5. Preparo de amostra**

A maior parte das amostras usadas no presente trabalho, possuem alta umidade, bem como um maior teor de gordura quando comparado as rações secas.

Dessa forma, a escolha de um método analítico necessita de um preparo da amostra, que tem por finalidade minimizar os possíveis interferentes e os erros que poderão ser introduzidos se a etapa de preparação não for conduzida corretamente.[36],[37]

No preparo de amostra sólida, é necessário convertê-la a uma forma líquida ou aquosa, em que os analitos estarão solubilizados e a matriz orgânica removida ou reduzida. Este tipo de preparo pode envolver uma dissolução direta em água ou em solução aquosa sem mudança química, ou em soluções aquosas ácidas em que haverá mudança química. Desse modo, a maneira de preparar e decompor uma amostra para análise depende da natureza dela, do

analito, bem como da sua concentração, do método de análise e da precisão e exatidão requeridas.[36],[37],[38]

Os procedimentos de preparo[36],[38] são divididos em:

- a) Digestão por via seca (decomposição em forno tipo mufla);
- b) Digestão via úmida em sistemas aberto ou fechado com aquecimento convencional ou por micro-ondas.

#### **1.5.1. Digestão via seca**

Este procedimento é usado para decomposição de amostras biológicas e orgânicas, as quais se refere aos alimentos em geral, usando um forno tipo mufla.[36],[38]

A digestão via seca é um método simples que consiste na queima da fração orgânica da amostra com o oxigênio do ar, obtendo-se resíduos inorgânicos na forma de cinza solúvel em ácido diluído. É um processo viável, pois pode ser empregado em diferentes tipos de amostras. E, por ser dissolvido em pequeno volume de ácido, permite determinações dos elementos presentes em baixas concentrações, além de ser um método que exige a utilização de poucos reagentes para a sua execução.[36],[38]

Entretanto, é um procedimento que pode levar a perdas parciais ou completas de elementos voláteis. Este fato depende da temperatura de decomposição a ser utilizada, porém esta limitação pode ser reduzida com a adição de compostos que retardem as perdas destes elementos, como por exemplo, o nitrato de magnésio ( $Mg(NO_3)_2$ ), que quando adicionado reage com os analitos da amostra evitando perdas destes elementos voláteis.[34],[36],[38] Além do risco de perdas parciais ou completas, o método da digestão via seca permite que o material em estudo mantenha-se exposto à contaminação, uma vez que necessita de um longo período para a queima da amostra.

Este tipo de decomposição pode também gerar cinzas de difícil dissolução na queima, bem como uma recuperação ineficiente de alguns elementos. No entanto, ele apresenta algumas vantagens, como a relação

flexível entre massa de amostra e volume final, não usa ácidos concentrados nem libera vapores de ácidos oxidantes, exige pouca atenção do operador e uma possibilidade de digestão do material em meio compatível com a técnica de determinação.[34],[36],[38]

#### **1.5.2. Digestão via úmida em sistemas aberto ou fechado com aquecimento convencional ou por micro-ondas**

A decomposição de materiais orgânicos ou biológicos por via úmida requer o aquecimento da amostra na presença de ácido mineral oxidante concentrado ou diluído, de misturas de ácidos oxidantes ou misturas de um ácido oxidante com peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), deixando os elementos de interesse na solução aquosa ácida na forma mineralizada e apropriada para análise. Os ácidos que apresentam propriedades oxidantes e comumente empregados neste tipo de decomposição são o ácido nítrico, o ácido sulfúrico ou o ácido perclórico.[36],[38]

Nos últimos anos, estudos mostraram que a utilização de reagentes diluídos apresentam algumas vantagens no processo de destruição da matéria orgânica nas amostras, sendo elas: a minimização de resíduos, menor valor do branco analítico, redução de danos aos componentes do equipamento, menor impacto ambiental e a colaboração com os princípios da “*Green Chemistry*”, conhecido como Química Verde.[39] Logo, torna-se oportuno a utilização dessa ideia em trabalhos que visam a redução de reagentes e que prezam pela qualidade da eficiência do método analítico aplicado.

A digestão por via úmida é um método empregado na determinação de elementos químicos em diferentes tipos de matrizes, uma vez que os elementos são convertidos na forma de cátions inorgânicos simples não voláteis, que ficam presentes na solução ácida. Este tipo de procedimento tem a vantagem em relação à digestão via seca por ser um método que requer uma temperatura menor, minimizando as perdas de elementos traço e a necessidade de um menor tempo de execução,[38] bem como a redução nos níveis de contaminação da amostra.

Esse tipo de digestão pode ser utilizada tanto em sistemas abertos como em sistemas fechados (por aquecimento convencional em blocos digestores ou por micro-ondas). Em sistemas abertos, é usado um método clássico para a decomposição de amostras orgânicas e inorgânicas, porém, neste tipo de procedimento pode ocorrer a volatilização de alguns elementos de interesse, devido a necessidade de um maior tempo para a decomposição total da amostra.[38]

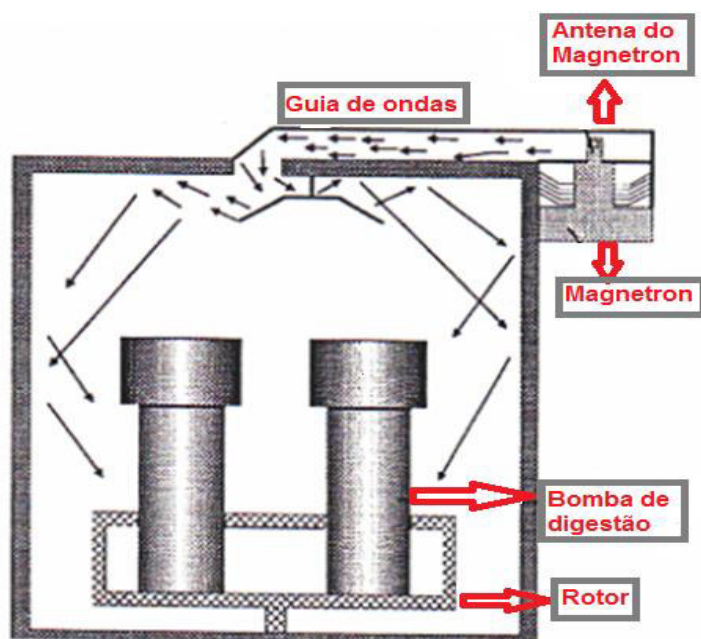
Dentre os métodos utilizados em sistemas fechados, destacam-se os métodos por via úmida a altas temperaturas empregando o aquecimento por convecção (bloco digestores, chama ou fornos convencionais) e por micro-ondas, os quais utilizam ácidos minerais oxidantes e peróxido de hidrogênio em seu procedimento. Existem também métodos menos convencionais por via úmida a baixas temperaturas, como o método de Fenton, os métodos enzimáticos, a decomposição com surfactante e a irradiação por ultravioleta.[38]

O uso de sistemas fechados é o mais empregado na decomposição de grande variedade de amostras para uma posterior determinação elementar, usando diversas técnicas analíticas, uma vez que é eficiente na digestão de amostras de difícil decomposição, bem como na determinação de elementos voláteis, utilizando um menor consumo de reagentes de alta pureza.[36],[38],[40],[41] Diversos equipamentos robustos, sofisticados e que apresentam eficiência na digestão de amostras estão sendo bastante produzidos, tais como os fornos micro-ondas.

Na digestão assistida por micro-ondas, as amostras são expostas a ondas eletromagnéticas que se estendem por uma faixa de frequência do espectro eletromagnético de 300 a 300.000 MHz. Atualmente, os fornos com aquecimento assistido por micro-ondas para fins analíticos possuem tecnologia que possibilita ótimo desempenho para amostras orgânicas e inorgânicas, por ser um instrumento que apresenta uma radiação eletromagnética não ionizante que provoca movimento das espécies em solução pela migração de íons e/ou rotações de dipolos.[37],[38]

O equipamento do forno micro-ondas apresenta seis componentes básicos em seu interior:[37],[38] O gerador de micro-ondas (magnetron); guia de ondas; cavidade das micro-ondas; agitador (espalha as ondas); circulador e exaustor de ar, como mostrado na Figura 3 alguns destes componentes.

**Figura 3.** Esquema de um forno de micro-ondas. Adaptado de Krug *et al* [38]



O sistema de aquecimento convencional por bloco digestor em sistema fechado também tem sido bastante utilizado, pois, assim como o aquecimento por micro-ondas, este apresenta um excelente desempenho para a decomposição de amostras orgânicas e inorgânicas.[38]

O aquecimento em bloco digestor com sistema fechado, em comparação com o aquecimento por micro-ondas, tem a vantagem de ser um equipamento com maior frequência analítica e muito comum de ser encontrado em laboratórios de análises, devido ao seu baixo custo de aquisição e manutenção, que é inferior ao forno micro-ondas, fornecendo uma maior facilidade aos analistas na execução do trabalho aliado a redução de custos.[38]

O aquecimento em bloco digestor torna-se ainda uma melhor escolha para digestão de amostras em sistemas fechados por ser um equipamento que não emite ondas eletromagnéticas durante sua execução, tornando assim a análise mais segura e apropriada para os analistas. Contudo, devem ser observadas algumas limitações para os aquecimentos em sistemas fechados, sendo elas:[36],[41]

- A massa das amostras deve ser reduzida ( $< 1,0$  g inorgânica e  $< 0,5$  g orgânica), devido à possibilidade do aumento da pressão interna que se desenvolve na bomba gerada pelos produtos gasosos das reações de decomposição;
- A homogeneidade das amostras para evitar diferenças entre os frascos durante a decomposição;
- A decomposição de ligas metálicas e metais que podem gerar o gás hidrogênio ( $H_2$ ), que aumenta o risco de explosão;
- A necessidade de resfriamento e abaixamento da pressão dos frascos para adição de reagentes durante o ciclo de aquecimento.

Mesmo com as referidas limitações, este sistema de preparo de amostra torna-se atrativo devido a sua eficiência nos procedimentos de pré-tratamento das amostras e do seu baixo custo. Além de possibilitar o uso de reagentes diluídos, ele mantém a concepção da Química Verde, um tipo de prevenção que almeja a minimização da utilização de solventes e a redução da geração de resíduos, conservando assim os recursos ambientais.[94]

### **1.5.3. Análise direta de sólidos**

A análise direta de sólidos é um método que, além de ser efetuado por meio de amostragem direta de uma amostra pulverizada (alta homogeneidade), pode ser efetuado ainda por suspensão, que consiste na dispersão da amostra em um solvente, e em seguida, introduzida no sistema de atomização ou de medida. As amostras usadas devem ter tamanhos de partícula controlado, o qual é obtido passando-as em peneira de diâmetro conhecido.[59]

O método de análise direta de sólidos pode ser empregado como uma alternativa em comparação aos procedimentos convencionais de preparo de

amostra. Ele apresenta uma redução dos riscos de contaminação da matriz e de perdas dos analitos na etapa de preparo, além da redução da sua manipulação, o que acarreta a minimização dos erros inerentes desta etapa crítica que antecede a análise química.[42],[43],[54]

Desta forma, este tipo de procedimento proporciona um aumento na sensibilidade, pois as amostras não passam por um processo de diluição, tornando-o mais eficiente e fornecendo bons resultados analíticos, uma vez que o uso de ácidos na decomposição das amostras podem, muitas vezes, tornar a análise comprometida na determinação de elementos em baixa concentração.[55]

Diante disto, a análise direta de sólidos resulta em benefícios econômicos e ambientais, pois além de ser uma técnica que proporciona resultados rápidos por reduzir o preparo da amostra, apresenta a possibilidade de análises de pequenas quantidades da mesma.[59]

No entanto, a técnica de análise direta de sólidos (SS) junto à espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite (GF AAS) possui algumas limitações como a introdução de grande quantidade de massa da amostra sólida diretamente no forno de grafite, podendo resultar em um aumento da absorção de fundo e, conseqüentemente, o aumento de interferências espectrais, devido à quantidade de matriz que é inserida no atomizador. [64],[65],[98]

O problema do aumento de interferências espectrais pode ser solucionado com o uso da espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite (HR-CS GF AAS), por ser esta uma redefinição com inúmeras vantagens da espectrometria de absorção atômica, sendo viável para análises de elementos em baixas concentrações, ou seja, em níveis de traços .[64],[65],[98]

## 1.6. Técnicas de espectrometria atômica para análises químicas

A procura por métodos analíticos cada vez mais seletivos, econômicos e robustos é almejada pela Química Analítica, uma vez que as técnicas instrumentais que apresentam estas características proporcionam um avanço da área a qual é destinada e têm fundamental importância para muitos campos da Ciência. Com isso, métodos analíticos mais sensíveis e confiáveis estão sendo desenvolvidos e utilizados nas pesquisas em uma variedade de matrizes.[44],[45]

Na literatura, diversos trabalhos têm sido relatados utilizando estas técnicas baseadas na espectrometria atômica, a exemplo do trabalho realizado por Nunes *et al.* (2011)[50] que determinaram Cu, Fe, Ni e Zn em amostras de óleos de soja, oliva e girassol, empregando a espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e chama (HR-CS FAAS).

No trabalho realizado por Bilo *et al.* (2015)[58] foi determinada a absorção de metais em solo para o plantio de arroz utilizando a técnica de espectrometria de fluorescência de raios X. Empregando a técnica de EDXRF, Teixeira *et al.* (2012)[56] determinaram Mn e Zn em amostras de arroz.

Por sua vez, Moraes *et al.* (2009)[52] determinaram Fe, Zn e Cu em alimentos por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) e espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica em forno de grafite (GF AAS). E Demirel *et al.* (2008)[47] determinaram elementos em níveis traço em diferentes tipos de alimentos usando a FAAS.

Enquanto, Tuzen (2003)[46] determinou Pb, Cd, Fe, Cu, Mn e Zn em peixe usando GF AAS. Fernández *et al.* (2015)[51] desenvolveram métodos analíticos para aplicação na determinação de Cd, Hg e Pb em amostras de peixe, usando como técnica para determinação a espectrometria de absorção atômica com vapor frio (CV AAS).

Krawczyk (2014)[53] determinou as concentrações de Cr, Cu, Fe, Mn e Se em suplementos multivitamínicos dietéticos usando HR-CS GF AAS. Kinoshita *et al.* (2013)[57] aplicaram a técnica de EDXRF para determinar metomil, um



pesticida carbamato, no conteúdo retirado do estômago em casos de intoxicação.

Costa *et al.* (2013)[2] desenvolveram um método analítico para a determinação de quatorze elementos químicos (Ca, P, S, Zn, Ba, K, Sr, Mn, Mg, Al, Cd, Cu, Fe e Cr) em rações secas de cães e gatos por ICP OES. Também Kelly *et al.* (2013)[13] determinaram diversos elementos em ração para cães usando a técnica de espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS). Bressy *et al* (2013)[49] determinaram as concentrações de quinze elementos (Al, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Se, Sn, Sr, V e Zn) em amostras de três espécies de tomate usando ICP OES e ICP-MS. A Tabela 1 mostra o resumo dos trabalhos descritos acima.

**Tabela 1.** Trabalhos relatados na literatura usando técnicas de espectrometria atômica.

| Autores                 | Analitos   | Matriz                                  | Técnica          |
|-------------------------|--|---|------------------|
| Nunes <i>et al.</i>     | Cu, Fe, Ni e Zn  | Óleo de soja, oliva e girassol          | HR-CS FAAS       |
| Bilo <i>et al.</i>      | Metais pesados   | Arroz                                   | EDXRF            |
| Teixeira <i>et al.</i>  | Mn e Zn  | Arroz                                   | EDXRF            |
| Moraes <i>et al.</i>    | Fe, Zn e Cu  | Alimentos                               | FAAS e GF AAS    |
| Demirel <i>et al.</i>   | Elementos em nível traço                                   | Diversos alimentos                      | FAAS             |
| Tuzen <i>et al.</i>     | Pb, Cd, Fe, Cu, Mn e Zn                                    | Peixe                                   | GF AAS           |
| Fernández <i>et al.</i> | Cd, Hg e Pb  | Peixe                                   | CV AAS           |
| Krawczyk                | Cr, Cu, Fe, Mn e Se  | Suplementos multivitamínicos dietéticos | HR-CS GF AAS     |
| Kinoshita <i>et al.</i> | Metomil  | Estômago                                | EDXRF            |
| Costa <i>et al.</i>     | Ca, P, S, Zn, Ba, K, Sr, Mn, Mg, Al, Cd, Cu, Fe e Cr       | Rações secas para cães e gatos          | ICP OES          |
| Kelly <i>et al.</i>     | Diversos elementos   | Ração para cães                         | ICP-MS           |
| Bressy <i>et al.</i>    | Al, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Se, Sn, Sr, V e Zn | Três espécies de tomate                 | ICP OES e ICP-MS |

Estes trabalhos mostraram que as técnicas analíticas de espectrometria atômica são amplamente usadas na determinação de elementos químicos, e estão bem estabelecidas para determinação da composição química de alimentos em geral.

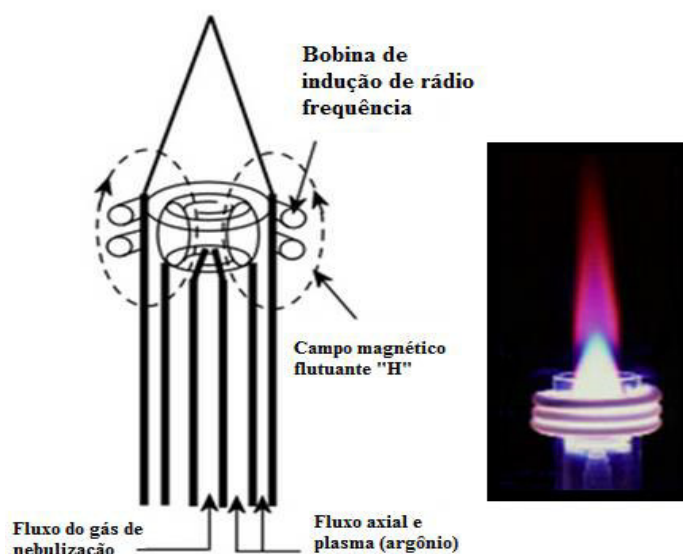
Assim, considerando a importância da qualidade das rações destinadas ao consumo de animais de estimação, foi realizada a determinação de microelementos, macroelementos e elementos traço nas rações úmidas

(sachês e enlatadas) e secas para cães e gatos, comercializadas nas cidades de Aracaju/Sergipe/Brasil e de Lisboa/Portugal utilizando as técnicas de espectrometria atômica.

### 1.7. Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente

A espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES) baseia-se na medida da radiação eletromagnética emitida por átomos excitados em um plasma, como o esquema mostrado na Figura 4. Este plasma pode ser definido como uma mistura gasosa condutora de eletricidade que apresenta uma concentração significativa de cátions e elétrons em movimento (as concentrações de ambos são tais que a carga total aproxima-se de zero).[68],[75],[76]

**Figura 4.** Esquema da geração do plasma para ICP OES



FONTE: Adaptado de (<http://www.chemiasoft.com/chemd/node/52>)

A energia do plasma é usada para converter os átomos e as moléculas em um estado excitado, em que as espécies excitadas retornam ao seu estado fundamental emitindo fótons que são medidos por um sistema de detecção.

Para a formação do plasma, usa-se uma fonte de tesla que proporciona descarga elétrica na região de entrada do gás do plasma.[68],[75],[76]

A tocha, mostrada na Figura 4, como é chamada a fonte típica do plasma indutivamente acoplado, consiste em três tubos de quartzo concêntricos, através dos quais passam fluxos de gás argônio. No ambiente do tubo, encontra-se a bobina de indução alimentada por um gerador de radiofrequência de 2 kW, capaz de produzir ondas com frequências entre 27 e 40 MHz.[68],[76]

Os íons argônio, uma vez formados no plasma, são capazes de absorver potência suficiente de uma fonte externa para manter a temperatura do plasma e, dependendo do projeto da tocha, a vazão total de consumo do argônio é entre 5 e 20 L min<sup>-1</sup>. Os íons resultantes e os elétrons associados interagem com o campo magnético produzido pela bobina de indução I, onde essa interação faz com que os íons e os elétrons dessa bobina fluam nos caminhos fechados anulares.[68],[76]

Existem duas formas de configuração visual para o espectrômetro: axial e radial. Na literatura, há controvérsias quanto à melhor configuração a ser utilizada, porém, de acordo com Brenner *et al* [77], a configuração axial da tocha permite obter melhor sensibilidade quando comparada com a radial, devido a um maior caminho óptico. Entretanto, a configuração axial está mais susceptível a interferências de origem molecular e de elementos facilmente ionizáveis na região do plasma, local de maior taxa de variação de temperatura.[77]

A técnica de ICP OES tem como vantagens a determinação simultânea ou sequencial de um grande número de elementos, alta sensibilidade e limites de detecção baixos (LoD) em micrograma por grama ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ). Logo, torna-se um método ótico relativamente livre de interferências espectrais, com uma ampla faixa de aplicação, análise rápida, robusta e uma extensa aplicabilidade em análises químicas [69],[70],[71],[72],[73],[74]. Embora apresente como limitação o alto custo de aquisição operacional e de manutenção dos seus suprimentos.

Na literatura são encontrados diversos trabalhos em que se usa como técnica o ICP OES para a determinação de inúmeros analitos em uma variedade de matrizes. A seguir faremos um breve apanhado das contribuições de alguns desses estudos que motivaram a determinação de macroelementos, microelementos e elementos traço em rações úmidas destinadas ao consumo de cães e gatos por ICP OES, como uma técnica eficiente, rápida e exata.

No trabalho realizado por Sánchez *et al.* (2016)[124] foi desenvolvido um método para a determinação de metais em etanol por detecção em ICP OES, e foram obtidos como LoD, valores que variaram entre 3 ng mL<sup>-1</sup> para Mn e 500 ng mL<sup>-1</sup> para Ca. E, no trabalho realizado por Souza *et al.* (2014)[71] foi desenvolvido um método analítico para a determinação simultânea de macronutrientes (Ca, Mg, Na e P), micronutrientes (Cu, Fe, Mn, e Zn) e elementos traço (Al, As, Cd, Pb e V) em fertilizantes minerais, em que obtiveram uma variação de LoD entre 0,6 mg kg<sup>-1</sup> para Mn e 23,2 mg kg<sup>-1</sup> para P.

Nunes *et al.* (2013)[125] desenvolveram um método analítico para a determinação de elementos minerais em amostras de carnes frescas e processadas usando o ICP OES como técnica para quantificação, em que foram obtidos LoD entre 0,05 µg g<sup>-1</sup> para P e 0,70 µg g<sup>-1</sup> para Fe. E Welna *et al.* (2015)[126] determinaram enxofre em óleo diesel utilizando a técnica de ICP OES, onde obtiveram LoD a partir de valores <2 µg g<sup>-1</sup>.

Cruz *et al.* (2015)[127] desenvolveram um método para a determinação de Ba, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, K, Li, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Sr, V e Zn em amostras de grafite empregando ICP OES, em que foram obtidos LoD entre 0,06 µg g<sup>-1</sup> para Mn e 6,54 µg g<sup>-1</sup> para Na. E Oliveira *et al.* (2015)[128] propuseram um método para a determinação de Ni, V e S em amostras de coque de petróleo usando a técnica de ICP OES para a determinação das concentrações dos metais analisados, em que foram obtidos LoD igual a 0,22 mg g<sup>-1</sup> para Ni, 0,12 mg g<sup>-1</sup> para V e 8,7 mg g<sup>-1</sup> para S.

Pereira Junior *et al.* (2016)[129], desenvolveram um método para a determinação de Ba, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, P, Pb e Zn em chás por ICP OES, no

qual obtiveram LoD que variaram entre 0,02  $\mu\text{g g}^{-1}$  para Zn e 0,72  $\mu\text{g g}^{-1}$  para Pb.

Nunes *et al.* (2013)[130], desenvolveram um método para a determinação de Fe, Mg, Mn, P e Zn em carnes processadas, usando o ICP OES, no qual obtiveram LoD que variaram entre 0,08  $\mu\text{g g}^{-1}$  para Mn e 0,70  $\mu\text{g g}^{-1}$  para Fe.

Diante disto, pode-se evidenciar que o ICP OES é amplamente usado por pesquisadores para a quantificação de diversos elementos químicos em uma variedade de matrizes, alcançando limites de detecção adequados para as análises.

No presente trabalho, foi realizado um estudo para a determinação de macroelementos, microelementos e elementos traço em rações úmidas destinadas ao consumo de cães e gatos por ICP OES, a fim de avaliar se as concentrações encontradas nestes alimentos estão de acordo com os valores permitidos por órgãos reguladores. Para realizar a digestão da amostra foi proposto um planejamento fatorial  $2^k$  com a finalidade da otimização dos reagentes diluídos empregados, tempo e temperatura de digestão das amostras em bloco digestor em sistema fechado.

#### **1.8. Espectrometria de absorção atômica com fonte contínua de alta resolução e forno de grafite**

Dentre as técnicas de espectrometria atômica, a espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua (HR-CS AAS) torna-se uma ferramenta analítica poderosa, devido à capacidade de visibilidade do ambiente espectral em alta resolução, correção automática dos eventos contínuos, uso de uma única fonte de emissão, uso do método de mínimos quadrados para remover interferências e a correção automática e simultânea de fundo contínuo.[54],[60],[61],[62],[67]

A HR-CS AAS, quando usada com um atomizador de tubo de grafite, é uma das técnicas que vem se destacando na determinação de elementos traço em diferentes matrizes. Ela possibilita, além da análise convencional líquida, a

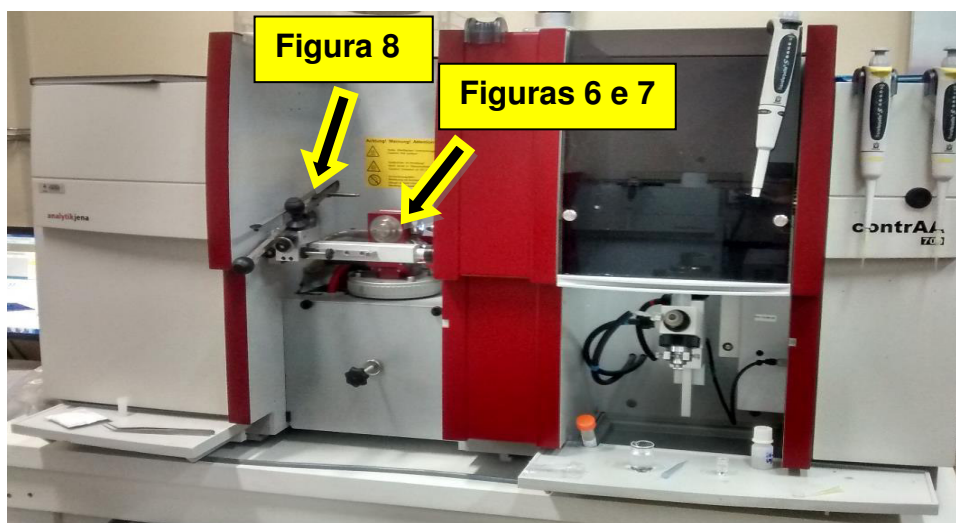
análise direta de sólidos (SS), tornando-se assim atrativa, devido às suas características relacionadas à alta sensibilidade e seletividade, baixos limites de detecção, custo razoável da instrumentação, redução da contaminação da amostra, redução na perda de analitos voláteis, uso de poucos reagentes e um tempo de análise minimizado.[54],[60],[61],[62],[67]

Esta técnica utiliza como fonte de radiação uma única lâmpada de arco curto de xenônio com alta intensidade, que permite medir comprimentos de onda dentro da faixa espectral entre 189 e 900 nm. Além disso, este equipamento é composto de um monocromador duplo de alta resolução, constituído por um prisma para pré-dispersão da radiação e uma grade *Echelle* para uma melhor resolução espectral. É uma técnica que contribui com os princípios da Química Verde, pois não usa ácidos ou solventes durante a análise direta, quando comparadas a outras técnicas de análise.[63],[64],[65],[66]

Diante de todas as vantagens citadas, a técnica de HR-CS GF AAS torna-se interessante para aplicações de rotina, uma vez que, propicia resultados precisos e exatos utilizando massas em miligramas ou microgramas (mg e µg), e amostras que podem ser analisadas sem preparação prévia e sem nenhum tipo de diluição, permitindo um maior poder de detecção para baixas concentrações do analito.[54],[60],[61],[62],[67]

No espectrômetro HR-CS GF AA mostrado na Figura 5, a amostra sólida é depositada diretamente sobre uma plataforma de grafite pirolítico (Figura 6), que é inserida manualmente no interior do forno de grafite (Figuras 7 e 8) por uma janela lateral com o auxílio de uma pinça para a queima e posterior quantificação dos analitos.[38]

**Figura 5.** Equipamento de HR-CS GF AAS - modelo ContrAA 700 da Analytik Jena.



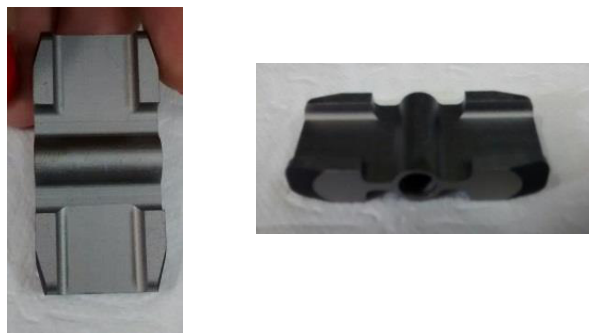
FONTE: Acervo pessoal DAYARA VIRGÍNIA LINO ÁVILA.

**Figura 6.** Plataforma de grafite pirolítico utilizada em HR-CS GF AAS.



FONTE: Acervo pessoal DAYARA VIRGÍNIA LINO ÁVILA.

**Figura 7.** Forno de grafite utilizado em HR-CS GF AAS.



FONTE: Acervo pessoal DAYARA VIRGÍNIA LINO ÁVILA.



**Figura 8.** Pinça do amostrador manual.



FONTE: Acervo pessoal DAYARA VIRGÍNIA LINO ÁVILA.

A literatura reporta a utilização da análise direta de sólidos aplicada a diferentes amostras para a determinação de inúmeros analitos sendo considerada uma técnica satisfatória. No trabalho realizado por Zmozinski *et al* (2015)[104], foi desenvolvido um método para a determinação de arsênio inorgânico em peixes e mariscos empregando SS-HR-CS GF AAS, utilizando Pd/Mg e Triton X-100 como modificadores químicos. As massas para a determinação de arsênio variaram de 0,01-0,25 mg, obtendo-se um LoD de  $0,05 \mu\text{g kg}^{-1}$ , calculado para 0,25 mg de amostra introduzida no forno de grafite.

Borges *et al.* (2015)[54] investigaram as concentrações de cromo e tálio presentes em amostras de fertilizantes usando a SS-HR-CS GF AAS. Para a determinação de cromo foi utilizado magnésio na presença de Triton X-100 como modificador químico, já para a determinação de tálio não foi necessário o uso de modificador químico. As massas utilizadas para a determinação de cromo e tálio foram de 0,5 e 0,8 mg, respectivamente, em que foram obtidos LoD de  $60 \text{ ng g}^{-1}$  para cromo e de  $3 \text{ ng g}^{-1}$  para tálio.

Oliveira *et al.* (2014)[105] desenvolveram métodos para a determinação de cádmio e tálio em subprodutos de xisto betuminoso por HR-CS SS-GF AAS, em que foi usado Pd/Mg como modificador químico. A massa utilizada para a determinação de Cd foi de 0,3 mg que resultou em um LoD de  $3,4 \text{ ng g}^{-1}$ . Para

a determinação de TI foi usada uma massa de 2,0 mg, obtendo-se um LoD de 11 ng g<sup>-1</sup>.

Araujo *et al.* (2013)[67] determinaram prata em material particulado atmosférico (MPA) empregando HR-CS SS-GF AAS. Na determinação de prata, foi usado rutênio como modificador químico permanente. O LoD encontrado foi de 17 ng g<sup>-1</sup> no filtro baseado na massa de 0,34 mg da amostra e um LoD de 0,5 µg g<sup>-1</sup> para o MPA baseado em uma massa de 0,13 mg.

Araujo *et al.* (2011)[106] determinaram também mercúrio por HR-CS SS-GF AAS em MPA obtendo-se LoD de 40 ng g<sup>-1</sup> de mercúrio no filtro baseado em uma massa de 2,0 mg. Gunduz *et al.*[107] Usaram a SS-HR-CS GF AAS para a determinação de chumbo em amostras de grãos de arroz sem uso de modificador químico. O LoD obtido foi de 2,3 µg kg<sup>-1</sup> e uma massa característica de 8,0 pg.

Dittert *et al.* (2009)[109] desenvolveram um método para a determinação simultânea de Fe e Cr em amostra de petróleo bruto, e obtiveram valores de LoD para Fe e Cr de 0,6 mg kg<sup>-1</sup> e 1,0 µg kg<sup>-1</sup>, respectivamente. Estes valores foram calculados para uma massa de 4,0 mg.

Damin *et al.*; (2007)[131] desenvolveram um método para a determinação de Cd e Pb em amostras de carne fresca, e obtiveram valores de LoD para Cd e Pb de 1,9 µg kg<sup>-1</sup> e 0,13 µg kg<sup>-1</sup>, respectivamente. Estes valores foram calculados para uma massa de 10 mg de amostra usando Pd e Mg(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> como modificadores. O LoD para Pb, quando usou como modificador o Pd e o NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> foi de 2,6 µg kg<sup>-1</sup>.

Como visto, a HR-CS SS-GF AAS tem se mostrado satisfatória na determinação de analitos em diferentes matrizes, obtendo-se baixos limites de detecção para os métodos. Neste trabalho, dois métodos foram otimizados para a determinação dos elementos traço essenciais (cobalto e cromo) em rações para cães e gatos, os quais participam diretamente nas funções das enzimas.

### **1.9. Espectrometria de Fluorescência de Raios-X por Energia Dispersiva**

A espectrometria de fluorescência de raios X por energia dispersiva (EDXRF) é baseada na excitação do átomo através da interação com uma radiação eletromagnética. É uma ferramenta analítica sensível para a determinação de elementos traço e também é uma técnica analítica nuclear que permite detecção simultânea e determinação quantitativa e qualitativa multielementar.[78],[79],[80]

Essa técnica instrumental torna-se adequada para a análise direta de elementos em amostras sólidas, uma vez que utiliza feixes de elétrons para a determinação da composição química das superfícies dos sólidos, é sensível e não destrutiva, podendo dessa forma reutilizar a amostra que já foi analisada.[78],[79],[81],[80],[92]

O feixe de elétrons emitido nas determinações dos analitos quando atinge a superfície do sólido a ser analisado, retira um elétron de um nível mais interno, gerando assim uma vacância que será preenchida por outro elétron de uma camada mais externa, esse processo é conhecido como efeito fotoelétrico e proporciona a emissão de raios X característicos para cada elemento.[82]

A técnica de EDXRF dispõe de um baixo custo e rapidez nas análises, uma vez que não exige nenhum pré-tratamento da amostra.[81],[89] Dessa forma, torna-se uma excelente técnica para trabalhar no cotidiano, em razão também de utilizar quantidades mínimas de reagentes e vidrarias, minimizando a produção de resíduos e o impacto da atividade química no ambiente.[94] Na Figura 9, está mostrado um espectrômetro para EDXRF.

**Figura 9.** Espectrômetro de fluorescência de raios X com energia dispersiva.



FONTE: Acervo pessoal DAYARA VIRGÍNIA LINO ÁVILA.

Apesar destas vantagens, a EDXRF é uma técnica com LoD's elevados quando comparados aos alcançados por outras técnicas de espectrometria atômica, pois apresenta uma difícil detecção para elementos com números atômicos baixos (Na, B, Be, dentre outros). O rendimento de fluorescência torna-se baixo devido à perda de sinal resultante da absorção de raios X.[83],[84],[88],[90],[91],[93][94]

A literatura reporta a utilização desta técnica a diversos trabalhos para a determinação de inúmeros analitos em uma variedade de matrizes. As contribuições desses estudos foram cruciais para seleção e escolha de um método analítico para a determinação de zinco em rações secas destinadas a cães e gatos.

No trabalho realizado por De la Calle *et al.* (2013)[85], foi proposto um método rápido e simples para a determinação multielementar em plantas com detecção por EDXRF, em que foram obtidos valores de LoD menores que 443  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Otaka *et al.* (2014)[86] desenvolveram um método analítico para a determinação de elementos traço em amostras de soja usando a técnica de EDXRF, em que conseguiram LoD menores que 72  $\mu\text{g g}^{-1}$ .

Doyle *et al.* (2015)[87] determinaram os elementos Ca, Fe, Ni, S e V em amostras de óleos de petróleo bruto usando a técnica de EDXRF, em que obtiveram como LoD para tais elementos os valores de  $2,1 \mu\text{g g}^{-1}$  para Ca,  $2,2 \mu\text{g g}^{-1}$  para Fe,  $1,7 \mu\text{g g}^{-1}$  para Ni,  $17,0 \mu\text{g g}^{-1}$  para S, e de  $1,9 \mu\text{g g}^{-1}$  para V. Já Lee *et al.* (2016)[92] analisaram a eficácia do carbono ativado na determinação de iodo em amostras de água utilizando a EDXRF para a quantificação e obtiveram  $29 \mu\text{g L}^{-1}$  como LoD. An *et al.* (2015)[94] avaliaram a quantidade de flúor em materiais sólidos usando a EDXRF e obtiveram como LoD  $21,3 \text{ mg kg}^{-1}$ .

Desta forma, pode-se verificar a eficiência da EDXRF para a determinação de metais e ametais em uma gama de matrizes, alcançando LoD satisfatórios. Neste trabalho, foi desenvolvido um método analítico para a determinação de zinco em rações secas destinadas a cães e gatos, baseado em técnicas espectroanalíticas que se mostram eficientes, exatas e precisas para a determinação de macroelementos, microelementos e elementos traço, podendo, assim, serem aplicadas para as análises das rações destinadas aos referidos animais domésticos.

## **2. OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO PARA ANÁLISE DE RAÇÕES ÚMIDAS DE CÃES E GATOS POR ICP OES**

### **2.1. Objetivo geral**

Otimizar métodos analíticos de digestão aplicando planejamentos simultâneos para determinar as condições de decomposição das amostras para determinação de macroelementos, microelementos e elementos traço em rações úmidas de cães e gatos empregando a espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES).

### **2.2. Objetivos específicos**

- Aplicar um planejamento fatorial em dois níveis para estabelecer as condições de digestão das amostras de rações úmidas;
- Avaliar a eficiência de digestão da amostra de ração usando reagentes diluídos;
- Caracterizar os parâmetros de mérito do método analítico proposto;
- Avaliar a composição química das rações úmidas de cães e gatos comercializadas no Estado de Sergipe conforme as agências reguladoras.

### **2.3. Precauções com a manipulação e descarte das soluções**

No decorrer do desenvolvimento do trabalho, algumas precauções foram tomadas quanto aos materiais de uso individual, ou seja, equipamentos de proteção individual (EPI) como luvas, máscaras, óculos de proteção, jaleco, dentre outros, e também aos de uso coletivos como capela de exaustão e outros, mantendo assim a segurança de todas as pessoas que frequentam o laboratório. Os experimentos realizados geraram o mínimo de resíduos, os quais foram identificados e entregues aos responsáveis para o descarte adequado na Universidade Federal de Sergipe (UFS).

## 2.4. Amostragem

Cinco amostras de ração úmida de cães e cinco amostras de ração úmida de gatos foram adquiridas em supermercados da cidade de Aracaju-Sergipe, sendo respeitadas as regras para a preservação da amostra, evitando a exposição a cheiros fortes ou a ação de gases, mantendo-as em local fresco e ao abrigo da luz.

As amostras adquiridas foram coletadas a partir de embalagens lacradas disponíveis em estabelecimentos comerciais e são constituídas de variados sabores e composição nutricional para os animais domésticos (cães e gatos).

## 2.5. Materiais e reagentes

Os reagentes foram de grau analítico. As soluções foram preparadas usando água deionizada, obtida a partir de um sistema de purificação de água de osmose reversa (OS 20 LX, GEHAKA, SP-Brasil). O ácido nítrico e o peróxido de hidrogênio foram de qualidade suprapura (Merck, EUA).

Foi utilizada para a calibração externa instrumental a solução padrão multielementar contendo Ag, Al, B, Ca, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Na, Ni, P, Pb, Si, Sn, Sr, Ti, V e Zn de 100 mg L<sup>-1</sup> (Specsol®). Também se fez uso de soluções estoque de 1000 mg L<sup>-1</sup> (Specsol®) de Ca, Fe, K, Mg e P que foram utilizadas de acordo com a necessidade da faixa de trabalho.

Os materiais foram previamente descontaminados em solução de ácido nítrico a 10% (v v<sup>-1</sup>) durante 24 horas[110],[111],[112], e posteriormente enxaguados com água deionizada e secos à temperatura ambiente.

## 2.6. Controle de qualidade e amostras de rações úmidas de cães e gatos

Para avaliar a exatidão do método proposto foi realizada a análise de materiais de referência certificados (CRM) do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (*National Institute of Standards and Technology* – NIST). Os materiais de referência de folha de maçã (NIST 1515), folha de pessegueiro

(NIST 1547) e folha de tomate (NIST 1573) foram utilizados, uma vez que o laboratório não dispunha de CRMs para rações de cães e gatos. Foi realizado também um teste de adição e recuperação para avaliar a exatidão do método proposto.

Na determinação da composição mineral, foi realizada a análise de 10 amostras de ração úmida de cães e gatos comercializadas em supermercados da cidade de Aracaju, Sergipe, Brasil.

## **2.7. Preparo das amostras**

O pré-tratamento das amostras consistiu em retirá-las das embalagens (200 g) homogeneizando-as e armazenando-as em tubos de PTFE a fim de realizar a sua secagem em liofilizador (Liofilizador, LIOTOP modelo L 101) durante um tempo de 120 horas (5 dias). Após a liofilização, as amostras foram trituras manualmente com o auxílio de um almofariz e pistilo de porcelana, para uma maior superfície de contato, e, em seguida, para a obtenção de menores partículas e uma melhor homogeneização, pulverizadas em moinho de bolas (Retsch PM 100) em ciclos de 15 minutos cada amostra. O tamanho das partículas foi controlado, passando as amostras em peneira com diâmetro menor que 150  $\mu\text{m}$ . As amostras foram armazenadas em tubos falcon de 50 mL e mantidas em dessecador.

A determinação da umidade foi realizada por análise gravimétrica em que 1,0 g da amostra de ração foi liofilizada. A porcentagem da massa obtida foi calculada pela diferença da massa inicial pesada e da massa após liofilização da amostra (análise gravimétrica).[40]

## **2.8. Digestão em bloco digestor em sistema fechado**

Aproximadamente 50 mg de amostra liofilizada e pulverizada (matéria seca) foi medida em balança analítica, e transferida para bombas de PTFE apropriadas para digestão em bloco digestor em sistema fechado.



Em seguida, foram adicionados 2,10 mL de  $\text{HNO}_3$  concentrado (65% m m<sup>-1</sup>), 1,66 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30% m m<sup>-1</sup>) e 6,24 mL de água deionizada, totalizando um volume final de 10,0 mL no frasco, sendo estes valores adicionados obtidos através do planejamento fatorial 2<sup>k</sup>. A digestão em sistema fechado foi realizada num tempo total de 2 horas sob um aquecimento de 170°C, sendo que estes valores ótimos foram obtidos através de um planejamento fatorial 2<sup>k</sup>, futuramente descrito.

Os digeridos foram transferidos para tubos de polipropileno de 50,0 mL (tipo falcon) e avolumados para 15,0 mL com água deionizada. As amostras, as soluções branco e os materiais de referências certificados (CRM) foram preparados em triplicata, conforme procedimento descrito acima.

## 2.9. Instrumentação

Para a determinação da concentração dos macroelementos, microelementos e elementos traço nas rações úmidas, foi utilizado um espectrômetro de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente (ICP OES) com vista axial (Vista Pro, Varian, Mulgrave, Austrália) e um detector de estado sólido resfriado a -35°C por um sistema *Peltier*. O policromador *Echelle* termostatizado permite medidas espectrais na faixa entre 167 e 785 nm. O equipamento encontra-se instalado no Instituto Tecnológico e de Pesquisas do Estado de Sergipe (ITPS), localizado na Rua Campo do Brito, 371, Bairro São José, Aracaju/SE.

O gás utilizado para a formação do plasma foi o argônio (99,9999%, White Martins, São Paulo/SP). As condições operacionais do ICP OES estão apresentadas na Tabela 2. As condições operacionais utilizadas foram otimizadas em outro trabalho do nosso grupo de pesquisa.[2]

## 2.10. Análise dos dados

As análises foram realizadas em triplicata e os dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão. Os dados do planejamento dos experimentos foram executados no programa computacional Statistica® 6.0.

**Tabela 2.** Características e condições operacionais utilizadas no ICP OES com vista axial para a determinação simultânea de macroelementos, microelementos e elementos traço em ração de cães e gatos úmida.

| Parâmetros                                      |                              | Valor Experimental |
|---|------------------------------|--------------------|
| Potência de radiofrequência (W)                 |                              | 1200               |
| Vazão de gás no plasma (L min <sup>-1</sup> )   |                              | 15,0               |
| Vazão de gás auxiliar (L min <sup>-1</sup> )    |                              | 1,5                |
| Vazão do gás nebulizador (L min <sup>-1</sup> ) |                              | 1,0                |
| Tipo de nebulizador                             | Concêntrico (tipo Sea Spray) |                    |
| Câmara de nebulização                           | Tipo ciclone                 |                    |
| Replicatas                                      |                              | 4                  |
| Diâmetro do tubo injetor (mm)                   |                              | 2,4                |
| Tempo do sinal de integração (s)                |                              | 1,0                |
| Comprimentos de onda (nm)                       | Al II (167,019)              | B I (249,772)      |
| (I) – linha atômica // (II) Linha iônica        | Ba II (455,403)              | C I (193,027)      |
|   | Ca II (373,690)              | Cu II (213,598)    |
|   | Fe II (259,940)              | K I (766,491)      |
|   | Mg I (285,213)               | P I (178,222)      |
|   | Mn II (260,568)              | Sr I (421,552)     |
|   | Zn I (213,857)               |                    |

## **2.11. Resultados e Discussão**

### **2.11.1. Otimização das condições de digestão das amostras no bloco digestor em sistema fechado a partir de um planejamento fatorial em dois níveis.**

Para a otimização do método analítico de decomposição das amostras no bloco digestor em sistema fechado, foi usada uma amostra comercial de ração úmida de gato, previamente liofilizada e pulverizada.

Na amostra de ração foi aplicado um planejamento fatorial em dois níveis ( $2^k$ ), visando minimizar a utilização de reagentes, concomitante a utilização de reagentes diluídos, que tem se mostrado atrativo na decomposição da matéria orgânica em amostras sólidas, colaborando dessa forma com os princípios da Química Verde.[113],[114]

A matriz do planejamento fatorial  $2^4$ , com triplicata do ponto central foi desenvolvida a fim de avaliar as diferentes proporções de reagentes, tempo e temperatura do método proposto. As concentrações dos reagentes diluídos ( $\text{HNO}_3$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ ), o tempo e a temperatura de digestão foram as variáveis empregadas no preparo das amostras, em que foi obtida como resposta (variável dependente) do planejamento, a concentração de carbono residual presente nas amostras em cada experimento. Estes valores obtidos de carbono residual foram valores normalizados para uma massa de 50 mg de amostra, a partir da concentração obtida por ICP OES, em  $\text{mg L}^{-1}$ . As concentrações de carbono nos experimentos do planejamento fatorial foram obtidas utilizando a linha de emissão em 193,027 nm.

A resposta obtida para os valores de carbono residual foi multiplicada por (-1) para a obtenção de uma resposta negativa, porque o que se deseja como resposta é a menor concentração de carbono residual durante o processo de digestão, ou seja, a concentração mínima, sendo esta a melhor resposta para uma eficiente digestão das amostras de rações de cães e gatos.

Na Tabela 3, apresenta-se a matriz do planejamento fatorial  $2^4$  otimizado para a decomposição das amostras no bloco digestor. Os experimentos foram realizados em ordem aleatória. A triplicada do ponto central foi utilizada para estimar o erro experimental no planejamento fatorial proposto.

Os experimentos foram realizados com o objetivo de investigar quais variáveis influenciavam no processo de digestão. Diante disto, foi construído o gráfico de Pareto para analisar o efeito das variáveis independentes e suas interações sobre a resposta escolhida.

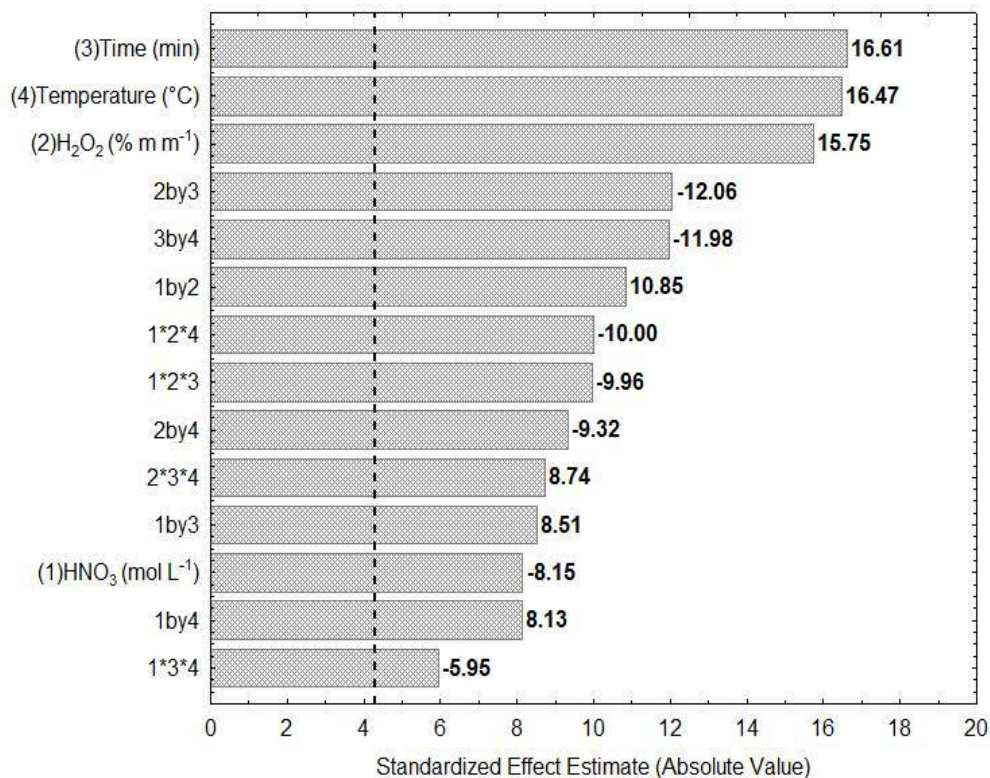
O gráfico de Pareto mostrado na Figura 10 foi traçado em função das concentrações de ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) diluído, peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) diluído, tempo e temperatura, sendo a magnitude dos efeitos representada pelas colunas e a linha transversal o significado estatístico para  $p=0,05$ , ou seja, os fatores maiores que a linha transversal são estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança.[71],[72]

A representação gráfica mostra que todas as variáveis e suas interações para três níveis são significativas. As variáveis de concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , tempo e temperatura para a digestão no bloco digestor fechado foram significativos apresentando efeitos quando positivos. Já a concentração da variável de  $\text{HNO}_3$  foi significativa com um valor de efeito negativo para o planejamento proposto com nível de confiança de 95%. A curvatura provou não ser significativa, mostrando uma planaridade local.

**Tabela 3.** Matriz do Planejamento fatorial  $2^4$  com três pontos centrais, com os níveis codificados e valores reais para as variáveis e os valores de Carbono residual como resposta.

| <b>Níveis Codificados e Valores Reais</b> |  |   |                |                     |  |
|---|--|---|----------------|---------------------|--|
| Experimentos                              | HNO <sub>3</sub><br>(mol L <sup>-1</sup> ) | H <sub>2</sub> O <sub>2</sub><br>(% m m <sup>-1</sup> ) | Tempo<br>(min) | Temperatura<br>(°C) | Carbono<br>residual<br>(mg L <sup>-1</sup> ) |
| 1   | -1 / 1,0                                   | -1 / 3,0  | -1 / 60        | -1 / 130            | -1167  |
| 2   | +1 / 3,0                                   | -1 / 3,0  | -1 / 60        | -1 / 130            | -2773  |
| 3   | -1 / 1,0                                   | +1 / 5,0  | -1 / 60        | -1 / 130            | -1052  |
| 4   | +1 / 3,0                                   | +1 / 5,0  | -1 / 60        | -1 / 130            | -827   |
| 5   | -1 / 1,0                                   | -1 / 3,0  | +1 / 120       | -1 / 130            | -829   |
| 6   | +1 / 3,0                                   | -1 / 3,0  | +1 / 120       | -1 / 130            | -892   |
| 7   | -1 / 1,0                                   | +1 / 5,0  | +1 / 120       | -1 / 130            | -755   |
| 8   | +1 / 3,0                                   | +1 / 5,0  | +1 / 120       | -1 / 130            | -774   |
| 9   | -1 / 1,0                                   | -1 / 3,0  | -1 / 60        | +1 / 170            | -886   |
| 10  | +1 / 3,0                                   | -1 / 3,0  | -1 / 60        | +1 / 170            | -964   |
| 11  | -1 / 1,0                                   | +1 / 5,0  | -1 / 60        | +1 / 170            | -687   |
| 12  | +1 / 3,0                                   | +1 / 5,0  | -1 / 60        | +1 / 170            | -725   |
| 13  | -1 / 1,0                                   | -1 / 3,0  | +1 / 120       | +1 / 170            | -766   |
| 14  | +1 / 3,0                                   | -1 / 3,0  | +1 / 120       | +1 / 170            | -727   |
| 15  | -1 / 1,0                                   | +1 / 5,0  | +1 / 120       | +1 / 170            | -714   |
| 16  | +1 / 3,0                                   | +1 / 5,0  | +1 / 120       | +1 / 170            | -639   |
| 17  | 0 / 2,0                                    | 0 / 4,0   | 0 / 90         | 0 / 150             | -895   |
| 18  | 0 / 2,0                                    | 0 / 4,0   | 0 / 90         | 0 / 150             | -871   |
| 19  | 0 / 2,0                                    | 0 / 4,0   | 0 / 90         | 0 / 150             | -808   |

**Figura 10.** Gráfico de Pareto do planejamento fatorial  $2^4$  com triplicata do ponto central usando a concentração de  $\text{HNO}_3$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$ , tempo e temperatura como variáveis independentes.



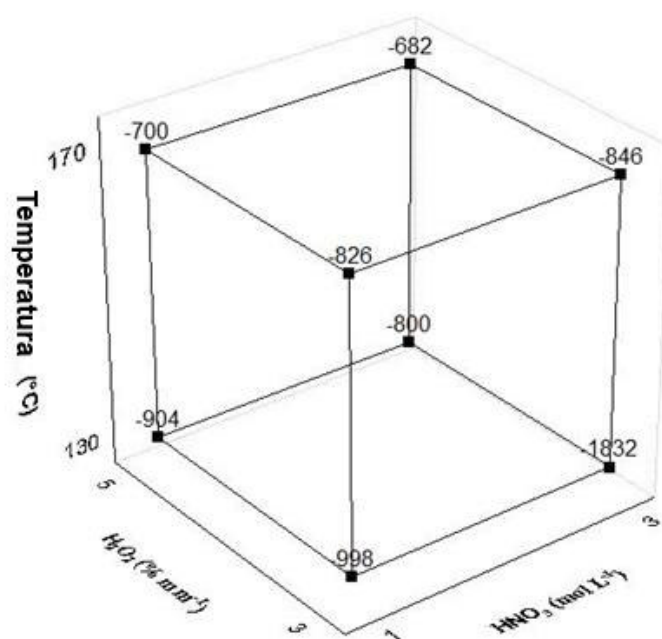
A Figura 11 mostra o gráfico em cubo da interação entre o ácido nítrico, o peróxido de hidrogênio e a temperatura, expondo que a melhor resposta do carbono residual foi obtida quando se utilizou valores máximos para as variáveis de  $\text{HNO}_3$  de 3,0 mol L<sup>-1</sup>,  $\text{H}_2\text{O}_2$  igual 5 % m m<sup>-1</sup> e temperatura de 170 °C (experimento 16). Mas, o gráfico de Pareto mostra que a interação 1\*2\*3 deve ter um efeito negativo sobre a melhor resposta, estando o experimento 15 o mais adequado quando utilizado para a digestão das rações úmidas para cães e gatos.

A Figura 12 mostra a interação entre o ácido nítrico, o peróxido de hidrogênio e o tempo, revelando que nestas interações o melhor valor de carbono residual nas amostras foi obtido quando se utilizou uma digestão com uma concentração de  $\text{HNO}_3$  de 3,0 mol L<sup>-1</sup>, de  $\text{H}_2\text{O}_2$  igual 5 % m m<sup>-1</sup>, e um

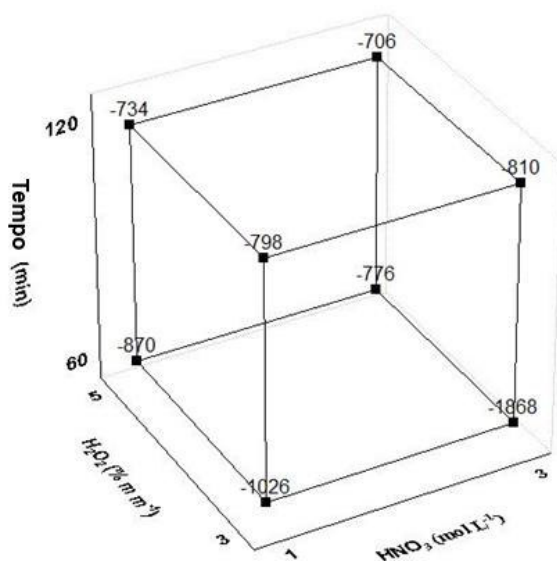
tempo de 120 minutos, confirmando assim o método do experimento 16, o qual foi usado para a digestão das amostras de rações úmidas de cães e gatos.

A figura 13 mostra a interação entre o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , tempo e temperatura, apresentando um efeito positivo para o melhor valor de carbono residual nas amostras quando se usa uma digestão com uma concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  5,0%  $\text{m m}^{-1}$ , o tempo de 120 minutos e a temperatura de 170 °C, confirmando assim que o experimento 16 foi mais adequado, o qual foi utilizado para a digestão das rações úmidas para cães e gatos.

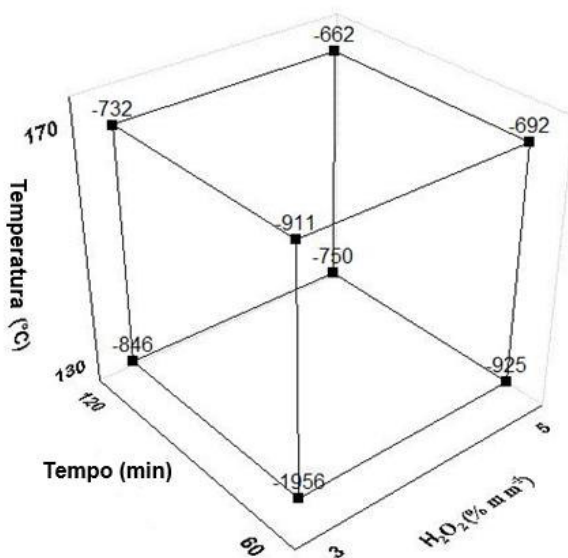
**Figura 11.** Gráfico em cubo do planejamento fatorial  $2^4$  com três pontos centrais para o  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  e Temperatura.



**Figura 12.** Gráfico em cubo do planejamento fatorial  $2^4$  com três pontos centrais para o  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  e tempo.



**Figura 13.** Gráfico em cubo do planejamento fatorial  $2^4$  com três pontos centrais para a temperatura, tempo e  $\text{H}_2\text{O}_2$ .





Após a análise simultânea dos dados, foi estabelecida a condição para a digestão das amostras de ração úmida para cães e gatos, sendo utilizada uma massa de 50 mg de amostra de ração previamente liofilizada, com uma solução de  $\text{HNO}_3$   $3,0 \text{ mol L}^{-1}$  (2,10 mL da solução concentrada a  $65\% \text{ m m}^{-1}$ ) e  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $5,0\% \text{ m m}^{-1}$  (1,66 mL da solução concentrada a  $30\% \text{ m m}^{-1}$ ) para um volume final de 10,0 mL. O tempo de 120 minutos e uma temperatura de  $170^\circ\text{C}$  foram aplicados, sendo esta a condição utilizada no experimento 16 do planejamento fatorial proposto conforme Tabela 3. Este foi o experimento que também apresentou um melhor valor para a concentração de carbono residual, ou seja, o experimento que proporcionou uma melhor digestão das amostras.

Da mesma forma, outra justificativa da escolha do experimento que apresentou todas as variáveis para um nível positivo, foi o fato de as amostras de rações úmidas liofilizadas usadas no presente trabalho apresentarem maiores teores de gordura quando comparadas com as rações do tipo secas.[2] Assim, a escolha das concentrações dos reagentes para um nível positivo proporcionaria uma digestão mais eficiente destas amostras.

Com o propósito de mostrar que a utilização dos reagentes em níveis máximos não acarretaria uma acidez residual inadequada para a introdução no sistema do ICP OES, a mesma foi determinada nas amostras digeridas de cada experimento realizado no planejamento fatorial por titulação ácido-base, sendo que esta determinação da acidez foi utilizada para quantificar a porcentagem de  $\text{HNO}_3$  regenerado no processo de digestão.[49]

A acidez residual foi determinada por uma titulação ácido-base utilizando uma solução de hidróxido de sódio ( $\text{NaOH}$ ) de concentração ( $0,0957 \pm 0,0001 \text{ mol L}^{-1}$ ) previamente padronizada com hidrogenoftalato de potássio ( $\text{C}_8\text{H}_5\text{KO}_4$ ), e fenolftaleína  $1,0\% \text{ m/v}$  de etanol como indicador.

Foi obtida uma acidez residual com concentração de  $2,76 \text{ mol L}^{-1}$  para o experimento 16. Após a diluição para 15 mL com água deionizada, a acidez residual obtida foi de  $1,84 \text{ mol L}^{-1}$ , sendo uma acidez adequada para a introdução no sistema do ICP OES. A regeneração do  $\text{HNO}_3$ [113] diluído nos

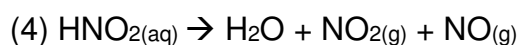
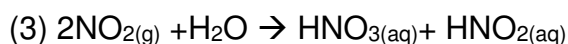
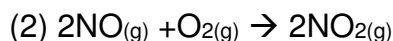
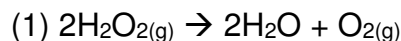
frascos reacionais obtiveram uma variação em porcentagem entre 72 a 102% como mostrado na Tabela 4.

**Tabela 4.** Valores de concentração e porcentagem dadas da acidez residual para os experimentos do planejamento fatorial.

| Exp. | Concentração Inicial (mol L <sup>-1</sup> ) | Concentração final (mol L <sup>-1</sup> ) | Concentração de ácido residual (mol L <sup>-1</sup> ) | Porcentagem regeneração do HNO <sub>3</sub> (%) |
|------|---|---|---|---|
| 1    | 1,0   | 0,68                                      | 1,02  | 102   |
| 2    | 3,0   | 1,86                                      | 2,79  | 93  |
| 3    | 1,0   | 0,68                                      | 1,02  | 102   |
| 4    | 3,0   | 1,88                                      | 2,82  | 94  |
| 5    | 1,0   | 0,65                                      | 0,98  | 98  |
| 6    | 3,0   | 1,84                                      | 2,76  | 92  |
| 7    | 1,0   | 0,68                                      | 1,02  | 102   |
| 8    | 3,0   | 1,78                                      | 2,67  | 89  |
| 9    | 1,0   | 0,65                                      | 0,98  | 98  |
| 10   | 3,0   | 1,78                                      | 2,67  | 89  |
| 11   | 1,0   | 0,65                                      | 0,98  | 98  |
| 12   | 3,0   | 1,9                                       | 2,85  | 95  |
| 13   | 1,0   | 0,68                                      | 1,02  | 102   |
| 14   | 3,0   | 1,44                                      | 2,16  | 72  |
| 15   | 1,0   | 0,68                                      | 1,02  | 102   |
| 16   | 3,0   | 1,84                                      | 2,76  | 92  |
| 17   | 2,0   | 1,3                                       | 1,95  | 98  |
| 18   | 2,0   | 1,3                                       | 1,95  | 98  |
| 19   | 2,0   | 1,3                                       | 1,95  | 98  |

Os valores da acidez residual são concordantes com a literatura, uma vez que é esperado que a concentração de HNO<sub>3</sub> seja regenerada pela presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante o processo de digestão em sistema fechado.[48] No mecanismo de decomposição da matéria orgânica através de HNO<sub>3</sub> diluído e

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em sistemas fechados, o ácido foi inicialmente consumido na oxidação da matéria orgânica gerando NO, que reage com O<sub>2</sub> na fase gasosa e gera NO<sub>2</sub>. O HNO<sub>3</sub> foi então regenerado perante redissolução do NO<sub>2</sub> em fase aquosa.[48],[113] As reações de decomposição da matéria orgânica ocorre até todo o O<sub>2</sub> ser consumido no processo como mostram as reações abaixo:[113]



Diante disto, o procedimento de digestão otimizado pode ser aplicado para análises tanto por ICP OES como por ICP-MS, uma vez que a concentração de ácido nítrico utilizada resultou em uma baixa acidez residual. Vale ressaltar que o uso de soluções diluídas de HNO<sub>3</sub> melhora o desempenho dos equipamentos de ICP OES e ICP-MS, evitando o desgaste dos componentes do equipamento que entra em contato com a amostra digerida, aumentando assim a vida útil dos mesmos.[49]

## 2.12. Caracterização dos parâmetros analíticos do método

### 2.12.1. Parâmetros analíticos do método otimizado

Uma variedade de parâmetros pode ser usado para definir um método analítico, dentre estes, pode-se citar o limite de detecção (LoD), limite de quantificação (LoQ), precisão e exatidão.

Para a caracterização do método analítico proposto, os elementos presentes nos CRM's foram determinados em diferentes comprimentos de onda disponíveis no programa computacional do espectrômetro (ICP OES), levando como condição a sensibilidade em ordem decrescente: Al (167,019 nm), B (249,772 nm), Ba (455,403 nm) Ca (373,690 nm) nm, Cu (213,598 nm), Fe (259,940 nm), K (766,491 nm), Mg (285,213 nm), Mn (260,568 nm), P (178,222 nm), Sr (421,552 nm), Zn (213,857 nm).

Na escolha das linhas de detecção para cada elemento, deve ser considerada a matriz da amostra, pois esta matriz pode apresentar substâncias que ocasionem erros sistemáticos na medida do sinal analítico. No presente trabalho, as linhas de emissão que apresentaram sensibilidade e que estavam livres de interferências espectrais, bem como as linhas utilizadas para os cálculos dos LoD, LoQ, razão sinal/ruído (SBR) e concentração equivalente ao sinal de fundo (BEC), estão apresentadas na Tabela 2.

O LoD é definido como sendo a menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, mas não necessariamente quantificado sob as condições experimentais estabelecidas.[68]

O LoD para o ICP OES foi calculado através do BEC, que é a concentração do analito que produz um sinal equivalente à intensidade de emissão de fundo na linha medida.[2] O LoD pode ser calculado através das Equações 1,2 e 3 de acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC):

$$BEC = \frac{C_{padrão}}{SBR} \quad \text{Equação 1}$$

$$SBR = \frac{(I_{padrão} - I_{branco})}{I_{branco}} \quad \text{Equação 2}$$

$$LoD = \frac{3 \times RSD_{branco} \times BEC}{100} \quad \text{Equação 3}$$

em que,  $C_{padrão}$  é a concentração do elemento de referência na solução,  $I_{padrão}$  a intensidade do elemento de referência e  $I_{branco}$  a intensidade do elemento de referência no branco e o  $RSD_{branco}$  é o desvio padrão relativo de dez medidas das intensidades de emissão das soluções branco no comprimento de onda escolhido.[2],[115]

O LoQ é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas[68] e foi calculado a partir da Equação 4:

$$\text{LoQ} = 3,33 \times \text{LoD}$$

**Equação 4**

No presente trabalho, os valores de LoD variaram de 0,1  $\mu\text{g g}^{-1}$  para o Mg, Ba e Sr a 15  $\mu\text{g g}^{-1}$  para o P. Os valores de LoQ obtidos variaram de 0,3  $\mu\text{g g}^{-1}$  para o Mg, Ba e Sr a 49,9  $\mu\text{g g}^{-1}$  para o P, conforme mostrado na Tabela 5, nas linhas escolhidas (em negrito na Tabela 5) para a determinação de Al, B, Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, P, Sr e Zn em rações úmidas para cães e gatos.

A precisão foi avaliada usando a repetitividade das análises em triplicata dos CRM's e pode ser expressa pelo desvio padrão relativo (%RSD) de um conjunto de medidas. As porcentagens dos RSD encontradas variaram entre 0,3% (Ba) a 14,6% (Cu). Esse alto valor para cobre é devido à diluição na qual foi submetido, uma vez que uma diluição alta acarreta valores próximos ao LoQ quando o elemento em questão está presente em baixas concentrações.

A exatidão pode ser definida como a aproximação e/ou concordância entre o valor medido experimentalmente e o valor convencionalmente verdadeiro que é mencionado no certificado do material de referência.[116]

Neste trabalho, a exatidão foi avaliada por meio da análise dos CRM's de folha de pêssego (NIST 1547), folha de maçã (NIST 1515) e folha de tomate (NIST 1573) e também através do teste de adição recuperação, visto que os CRM's analisados não são materiais de ração animal. Os valores alcançados para este teste ficaram dentro da faixa de 80 a 120% para todos os macroelementos, microelementos e elementos traço, como mostra a Tabela 6, evidenciando a exatidão do método analítico otimizado.[2]

A avaliação da exatidão está diretamente relacionada a padrões internacionais, para o qual os valores das concordâncias encontradas foram obtidos através da Equação 5.

$$\text{Concordância (\%)} = \frac{\text{Valor encontrado}}{\text{Valor certificado}} \times 100$$

**Equação 5**

em que, o valor encontrado é a medida da concentração encontrada da determinação do analito pelo método proposto e o valor certificado consiste no valor informado nos documentos certificados dos CRM's.

As concordâncias entre os valores certificados e os valores encontrados variaram entre  $80,2\% \pm 0,3$  (Ba) a  $113,8\% \pm 7,1$  (Zn), evidenciando que o método analítico foi exato na determinação multielementar por ICP OES, porque as concordâncias obtidas apresentaram erros menores que  $\pm 20\%$ .

Vale lembrar que, determinações quantitativas devem apresentar erros menores que  $\pm 30\%$ , e para semi-quantitativas e qualitativas erros entre  $\pm 30\%$  e  $\pm 50\%$ , e maiores que  $50\%$ , respectivamente.[68]

Diante disto, os valores obtidos por ICP OES para as análises dos elementos, Al, B, Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, P, Sr e Zn em CRMs de folha de pêssago (NIST 1547), folha de maçã (NIST 1515) e folha de tomate (NIST 1573) podem ser consideradas medidas quantitativas.[113]

Os resultados obtidos para a precisão e para a exatidão do método analítico otimizado podem ser observados na Tabela 7, a qual apresenta os valores certificados, valores encontrados, erro, percentual de concordância e o %RSD dos resultados.

**Tabela 5.** Valores de concentração equivalente ao sinal de fundo, limite de detecção e limite de quantificação obtidos para análise das amostras de rações úmidas destinadas a cães e gatos.

| <b>Elemento<br/>(<math>\lambda</math>=nm)</b> | <b>BEC<br/>(mg L<sup>-1</sup>)</b> | <b>LoD<br/>(<math>\mu\text{g g}^{-1}</math>)</b> | <b>LoQ<br/>(<math>\mu\text{g g}^{-1}</math>)</b> |
|---|------------------------------------|--|--|
| <b>Al (167,019)</b>                           | <b>0,007</b>                       | <b>1,0</b>                                       | <b>3,3</b>                                       |
| B (182,577)                                   | 0,230                              | 3,0  | 10,0   |
| B (249,678)                                   | 0,189                              | 2,0  | 6,7  |
| <b>B (249,772)</b>                            | <b>0,180</b>                       | <b>2,0</b>                                       | <b>6,7</b>                                       |
| <b>Ba (455,403)</b>                           | <b>0,001</b>                       | <b>0,1</b>                                       | <b>0,3</b>                                       |
| Ca (315,887)                                  | 0,083                              | 6,0  | 20,0   |
| Ca (317,933)                                  | 0,134                              | 28,0   | 93,2   |
| <b>Ca (373,690)</b>                           | <b>0,148</b>                       | <b>14,0</b>                                      | <b>46,6</b>                                      |
| <b>Cu (213,598)</b>                           | <b>0,004</b>                       | <b>2,6</b>                                       | <b>8,7</b>                                       |
| Cu (324,754)                                  | 0,010                              | 1,6  | 5,3  |
| Cu (327,395)                                  | 0,004                              | 2,1  | 7,0  |
| Fe (234,350)                                  | 0,055                              | 7,0  | 23,3   |
| Fe (239,563)                                  | 0,050                              | 2,0  | 6,7  |
| <b>Fe (259,940)</b>                           | <b>0,047</b>                       | <b>2,0</b>                                       | <b>6,7</b>                                       |
| K (404,721)                                   | 5,522                              | 931,0  | 3100,2   |
| K (693,527)                                   | 2,423                              | 265,,0   | 882,4  |
| <b>K (766,491)</b>                            | <b>0,108</b>                       | <b>6,0</b>                                       | <b>20,0</b>                                      |
| <b>Mg (285,213)</b>                           | <b>0,001</b>                       | <b>0,1</b>                                       | <b>0,3</b>                                       |
| Mg (383,829)                                  | 0,064                              | 6,0  | 20,0   |
| Mn (257,610)                                  | 0,002                              | 0,5  | 1,7  |
| Mn (259,372)                                  | 0,002                              | 0,2  | 0,7  |
| <b>Mn (260,568)</b>                           | <b>0,002</b>                       | <b>0,2</b>                                       | <b>0,7</b>                                       |
| P (177,434)                                   | 0,099                              | 23,0   | 76,6   |
| <b>P (178,222)</b>                            | <b>0,075</b>                       | <b>15,0</b>                                      | <b>49,9</b>                                      |
| P (213,618)                                   | 0,048                              | 17,0   | 56,6   |
| Sr (216,596)                                  | 0,003                              | 0,4  | 1,3  |
| <b>Sr (421,552)</b>                           | <b>0,0004</b>                      | <b>0,1</b>                                       | <b>0,3</b>                                       |
| Sr (460,733)                                  | 0,008                              | 0,5  | 1,7  |
| Zn (202,548)                                  | 0,003                              | 0,5  | 1,7  |
| Zn (206,200)                                  | 0,005                              | 0,3  | 1,0  |
| <b>Zn (213,857)</b>                           | <b>0,007</b>                       | <b>0,7</b>                                       | <b>2,3</b>                                       |

Parâmetros analíticos obtidos para massa de 50 mg de amostra de ração de cão e gato e avolumada para 15 mL.

**Tabela 6.** Valores do teste de adição e recuperação para os macroelementos, microelementos e elementos traço determinados em ração úmida de cães e gatos com digestão em sistema fechado no bloco digestor.

| <b>MACROELEMENTOS</b>                   |                                      |            |                                      |            |
|---|--------------------------------------|------------|--------------------------------------|------------|
| Elementos                               | Nível 1<br>(1500 µg/g)               | RSD<br>(%) | Nível 2<br>(9000 µg/g)               | RSD<br>(%) |
|   | <b>Recuperação (%)</b>               |            | <b>Recuperação (%)</b>               |            |
| Ca                                      | 114±10,3                             | 9,0        | 84±6                                 | 6,7        |
| K                                       | 108±4                                | 3,5        | 91±6                                 | 6,1        |
| Mg                                      | 106±2                                | 1,8        | 101±6                                | 5,8        |
| P                                       | 112±13                               | 11,6       | 89±12                                | 13,5       |
| <b>MICROELEMENTOS E ELEMENTOS TRAÇO</b> |                                      |            |                                      |            |
| Elementos                               | Nível 1<br>(150 µg g <sup>-1</sup> ) | RSD<br>(%) | Nível 2<br>(300 µg g <sup>-1</sup> ) | RSD<br>(%) |
|   | <b>Recuperação (%)</b>               |            | <b>Recuperação (%)</b>               |            |
| B                                       | 88±2                                 | 2,1        | 94±9                                 | 9,7        |
| Cu                                      | 106 ±1                               | 0,6        | 108±6                                | 5,4        |
| Fe                                      | 106±10                               | 9,2        | 104±14                               | 13,1       |
| Sr                                      | 88±3                                 | 3,2        | 98±3                                 | 3,0        |
| Zn                                      | 113±7                                | 5,9        | 110±9                                | 8,5        |



**Tabela 7.** Valores certificados, valores encontrados e o percentual das concordâncias para as análises dos materiais de referência certificados por ICP OES, usando como método de abertura de amostra a digestão úmida no bloco digestor.

|              | Valores        | Al<br>$\mu\text{g g}^{-1}$ | B<br>$\mu\text{g g}^{-1}$ | Ba<br>$\mu\text{g g}^{-1}$ | Ca<br>$\text{g kg}^{-1}$ | Cu<br>$\mu\text{g g}^{-1}$ | Fe<br>$\mu\text{g g}^{-1}$ | K<br>$\text{g kg}^{-1}$ | Mg<br>$\text{g kg}^{-1}$ | Mn<br>$\mu\text{g g}^{-1}$ | P<br>$\text{g kg}^{-1}$ | Sr<br>$\mu\text{g g}^{-1}$ | Zn<br>$\mu\text{g g}^{-1}$ |
|--------------|----------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------|--------------------------|----------------------------|-------------------------|----------------------------|----------------------------|
| NIST<br>1515 | Encontrado     | 262 ± 9                    | ***                       | ***                        | 1,37±0,02                | ***                        | ***                        | 1,38±0,01               | 0,266±0,003              | ***                        | 0,165±0,001             | ***                        | 14,23±0,88                 |
|              | Certificado    | 286 ± 9                    | ***                       | ***                        | 1,53±0,015               | ***                        | ***                        | 1,61±0,02               | 0,271±0,008              | ***                        | 0,159±0,011             | ***                        | 12,50±0,30                 |
|              | Concordância % | 91,6 ± 3,3                 | ***                       | ***                        | 89,5±1,2                 | ***                        | ***                        | 85,7±1,0                | 98,1±1,0                 | ***                        | 103,8±0,8               | ***                        | 113,8±7,10                 |
|              | Erro           | -8,6                       | ***                       | ***                        | -10,4                    | ***                        | ***                        | -13,79                  | -1,8                     | ***                        | 3,6                     | ***                        | 13,9                       |
|              | RSD %          | 3,3                        | ***                       | ***                        | 1,4                      | ***                        | ***                        | 1,0                     | 1,1                      | ***                        | 0,8                     | ***                        | 6,2                        |
| NIST<br>1547 | Encontrado     | 223±7                      | 30±0,4                    | 99,5±0,3                   | 1,37±0,03                | 3,16 ± 0,46                | 181,6±3,1                  | 2,04±0,03               | 0,437±0,006              | ***                        | 0,147±0,003             | 44,7±0,4                   | 16,75±1,22                 |
|              | Certificado    | 249±8                      | 29±2                      | 124±4                      | 1,56±0,02                | 3,70 ± 0,40                | 218,0±14,0                 | 2,43±0,03               | 0,430±0,008              | ***                        | 0,140±0,007             | 53,0±4,0                   | 17,90±0,40                 |
|              | Concordância % | 89,6 ±2,7                  | 103 ± 1                   | 80,2 ± 0,3                 | 87,8±2,1                 | 85,4±12,4                  | 83,3±1,4                   | 84,0±1,4                | 101,6±1,3                | ***                        | 105,0±2,0               | 84,3±0,8                   | 93,6±6,8                   |
|              | Erro           | -10,5                      | 3,5                       | -19,7                      | -12,2                    | -14,7                      | -16,7                      | -16,0                   | 1,1                      | ***                        | 7,5                     | -15,6                      | -6,4                       |
|              | RSD %          | 3,0                        | 1,4                       | 0,3                        | 2,4                      | 14,6                       | 1,7                        | 1,7                     | 1,3                      | ***                        | 1,9                     | 0,9                        | 7,3                        |
| NIST<br>1573 | Encontrado     | ***                        | ***                       | ***                        | 2,66±0,06                | 10,96±0,63                 | ***                        | ***                     | 0,713±0,022              | 202±2                      | 0,363±0,005             | ***                        | 58,61±2,39                 |
|              | Certificado    | ***                        | ***                       | ***                        | 3,00±0,03                | 11,00±1,00                 | ***                        | ***                     | 0,700*                   | 238±7                      | 0,340±0,020             | ***                        | 62,00±6,00                 |
|              | Concordância % | ***                        | ***                       | ***                        | 88,7±2,0                 | 99,6±5,8                   | ***                        | ***                     | 101,9±3,1                | 85±1                       | 106,8±1,7               | ***                        | 94,5±3,8                   |
|              | Erro           | ***                        | ***                       | ***                        | -11,2                    | -0,40                      | ***                        | ***                     | 1,9                      | -15                        | 6,7                     | ***                        | -5,5                       |
|              | RSD %          | ***                        | ***                       | ***                        | 2,3                      | 5,8                        | ***                        | ***                     | 3,1                      | 1,1                        | 1,5                     | ***                        | 4,1                        |

NIST 1573-Material Certificado de Folha de Tomate; NIST 1547- Material Certificado de Folha de Pêssego; NIST 1515- Material Certificado de Folha de Maçã.

\* - Valores não Certificados; Erro % = (encontrado- certificado)/ certificado X 100/ Concentração média ± desvio padrão (n=3).

### **2.12.2. Aplicação do método otimizado em rações úmidas para cães e gatos**

Neste trabalho, o procedimento de digestão de amostra foi aplicado em rações úmidas enlatadas destinadas a animais domésticos (cães e gatos) comercializadas em estabelecimentos da cidade de Aracaju - Sergipe. Foram analisadas 10 amostras, sendo 5 amostras de cães e 5 amostras de gatos de diferentes fabricantes e sabores variados.

As soluções obtidas após a digestão das amostras foram analisadas por ICP OES e as concentrações dos elementos estão expressas em  $\mu\text{g g}^{-1}$  e/ou  $\text{g kg}^{-1}$ , como mostrado na Tabela 8. As condições do ICP OES foram as mesmas estabelecidas no trabalho publicado por Costa *et al* (2013).[2]

As concentrações permitidas pela legislação são expressas em massa seca, então, neste trabalho os resultados das concentrações foram calculados da mesma forma. Logo, foi determinada a umidade das amostras por análise gravimétrica, pois de acordo com o MAPA, o teor de umidade em ração úmida para cães e gatos não deve ser menor que 65%.[95]

Os valores medidos para a umidade estiveram entre 45% e 95% para cães e de 52% a 87% para gatos, sendo que a não conformidade foi verificada em quatro amostras, sendo três de cães (duas do F1 e uma do F3) e uma de gato (do F5), como mostrado na Tabela 8.

**Tabela 8.** Concentrações dos elementos B, Ba, Ca, Fe, K, Mg, Mn, P, Sr e Zn em amostras úmidas de ração de cães e gatos, por ICP OES, usando como método de abertura de amostra a digestão úmida no bloco digestor em sistema fechado.

| FABRICANTE                    | SABOR            | UMIDADE (%) | B $\mu\text{g g}^{-1}$ | Ba $\mu\text{g g}^{-1}$ | Ca $\text{g kg}^{-1}$                  | Cu $\mu\text{g g}^{-1}$ | Fe $\mu\text{g g}^{-1}$ | K $\text{g kg}^{-1}$ | Mg $\mu\text{g g}^{-1}$ | Mn $\mu\text{g g}^{-1}$                | P $\text{g kg}^{-1}$                 | Sr $\mu\text{g g}^{-1}$ | Zn $\mu\text{g g}^{-1}$                  |
|-------------------------------|------------------|-------------|------------------------|-------------------------|--|-------------------------|-------------------------|----------------------|-------------------------|--|--------------------------------------|-------------------------|--|
| FB 1 <sup>Cão</sup>           | Carne            | 47          | 601±108                | 4,69±0,49               | 1,84±0,18                              | 44,0±2,1                | 739±102                 | 1,10±0,10            | 72,8±4,4                | 78±11                                  | 2,23±0,15                            | 63±5                    | 336±21                                   |
| FB 1 <sup>Cão</sup>           | Carne e vegetais | 45          | <6,7                   | 5,62±0,40               | 1,55±0,05                              | 43,7±2,2                | 841±37                  | 1,01±0,03            | 81,2±6,8                | 73±3                                   | 1,86±0,04                            | 49±1                    | 356±12                                   |
| FB 3 <sup>Cão</sup>           | Frango           | 56          | 229±33                 | <0,3                    | 1,67±0,11                              | 45,8±1,0                | 371±19                  | 1,05±0,02            | 74,3±0,2                | 53±7                                   | 2,09±0,05                            | 69±2                    | 332±5                                    |
| FB 3 <sup>Cão</sup>           | Carne            | 95          | <6,7                   | <0,3                    | 1,46±0,03                              | 50,1±3,1                | 448±24                  | 0,88±0,05            | 68,0±4,8                | 62±5                                   | 2,02±0,07                            | 41±2                    | 321±14                                   |
| FB 4 <sup>Cão</sup>           | Carne            | 65          | 119±20                 | 1,46±0,41               | 1,43±0,16                              | 28,9±0,7                | 195±23                  | 1,50±0,04            | 73,3±4,9                | 6±1                                    | 2,14±0,14                            | 14±2                    | 603±32                                   |
| FB 1 <sup>gato</sup>          | At e Sd*         | 69          | <6,7                   | 2,33±0,31               | 1,95±0,02                              | 59,2±0,9                | 372±19                  | 1,02±0,02            | 78,2±1,6                | 109±10                                 | 2,22±0,02                            | 41±2                    | 403±4                                    |
| FB 2 <sup>gato</sup>          | Carne            | 66          | 403±62                 | 2,91±0,17               | 1,86±0,04                              | 56,7±1,6                | 1220±47                 | 0,97±0,02            | 71,7±0,7                | 89±2                                   | 2,43±0,01                            | 74±1                    | 320±2                                    |
| FB 2 <sup>gato</sup>          | Peixe            | 78          | <6,7                   | 1,78±0,37               | 1,89±0,03                              | 55,2±1,1                | 366±17                  | 0,89±0,01            | 69,5±4,5                | 85±2                                   | 2,10±0,01                            | 35±1                    | 317±4                                    |
| FB 5 <sup>gato</sup>          | Peixe            | 87          | 61±14                  | 1,17±0,10               | 1,68±0,05                              | 13,9±1,0                | 164±4                   | 1,70±0,03            | 86,1±1,5                | 102±1                                  | 2,47±0,06                            | 20±1                    | 200±4                                    |
| FB 5 <sup>gato</sup>          | Atum             | 52          | <6,7                   | 2,23±0,21               | 1,69±0,02                              | 11,5±0,8                | 77±14                   | 1,48±0,02            | 81,0±1,3                | 80±2                                   | 2,37±0,03                            | 20±1                    | 224±6                                    |
| Concentração Mínima Permitida |                  |             | ***                    | ***                     | 6,0 <sup>A</sup>                       | 5,0 <sup>AG</sup>       | 80,0 <sup>A</sup>       | 6,0 <sup>A</sup>     | 400 <sup>A</sup>        | 5,0 <sup>AC</sup><br>7,5 <sup>AG</sup> | 5,0 <sup>A</sup><br>0,6 <sup>B</sup> | ***                     | 120 <sup>AC</sup><br>75 <sup>AG</sup>    |
| Concentração Máxima Permitida |                  |             | ***                    | ***                     | 25,0 <sup>AC</sup><br>2,4 <sup>B</sup> | 250 <sup>AC</sup>       | 3000 <sup>AC</sup>      | ***                  | 3000 <sup>AC</sup>      | ***                                    | 16,0 <sup>AC</sup>                   | ***                     | 1000 <sup>AC</sup><br>2000 <sup>AG</sup> |

A-Valores estabelecidos pela AAFCO<sup>[8]</sup>; B- Valores estabelecidos pelo MAPA<sup>[20]</sup>. AG- AAFCO para gatos. AC- AAFCO para cão. Valores expressos como média  $\pm$  desvio padrão. \*At e Sd- Atum e Sardinha.

As concentrações de Al ficaram abaixo do LoQ ( $3,3 \mu\text{g g}^{-1}$ ) proposto no método analítico em todas as amostras de rações úmidas de cães e gatos. As concentrações dos demais elementos variaram de:  $<6,7 - 601 \pm 108 \mu\text{g g}^{-1}$  para o B;  $<0,3 - 5,62 \pm 0,40 \mu\text{g g}^{-1}$  para o Ba;  $1,43 \pm 0,16 - 1,95 \pm 0,02 \text{ g kg}^{-1}$  para o Ca;  $11,5 \pm 0,8 - 59,2 \pm 0,9 \mu\text{g g}^{-1}$  para o Cu;  $77 \pm 14 - 1220 \pm 47 \mu\text{g g}^{-1}$  para o Fe;  $0,88 \pm 0,05 - 1,70 \pm 0,03 \text{ g kg}^{-1}$  para o K;  $68,0 \pm 4,8 - 86,1 \pm 1,5 \mu\text{g g}^{-1}$  para o Mg;  $6 \pm 1 - 109 \pm 10 \mu\text{g g}^{-1}$  para o Mn;  $1,86 \pm 0,04 - 2,47 \pm 0,06 \text{ g kg}^{-1}$  para o P;  $14 \pm 2 - 74 \pm 1 \mu\text{g g}^{-1}$  para o Sr;  $200 \pm 4 - 603 \pm 32 \mu\text{g g}^{-1}$  para o Zn.

Dessa forma, o Ca e o P foram os elementos que apresentaram concentrações conforme com a legislação do MAPA, porém as concentrações obtidas para estes elementos ficaram abaixo do mínimo permitido pela AAFCO. O Cu, Fe, Mn e Zn apresentaram concentrações dentro da faixa permitida pela AAFCO. Não houve comparação com o MAPA, pois este não fornece valores para estes elementos. O K e o Mg apresentaram concentrações abaixo do mínimo permitido pela AAFCO.

Os valores do resumo estatístico das concentrações dos macroelementos (Ca, Mg, P e K), microelementos (Cu, Fe, Mn e Zn) e elementos traço (B, Ba e Sr), determinados por ICP OES, são mostrados nas Tabelas 9 e 10. Também foram construídos gráficos para uma melhor visualização, como mostrados nas Figuras 14 e 15. No entanto, para o tratamento dos dados, foram retirados os valores menores que o LoQ para os elementos.

**Tabela 9.** Resumo estatístico das concentrações dos elementos nas amostras de rações de cães.

| Elementos                   | n | Média | Mediana | Desvio<br>Padrão | Mínimo | Máximo |
|-----------------------------|---|-------|---------|------------------|--------|--------|
| B ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )  | 3 | 316   | 229     | 252              | 119    | 601    |
| Ba ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | 3 | 3,92  | 4,69    | 2,18             | 1,46   | 5,62   |
| Ca ( $\text{g kg}^{-1}$ )   | 5 | 1,59  | 1,55    | 0,17             | 1,43   | 1,84   |
| Cu ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | 5 | 42,5  | 44      | 8,0              | 28,9   | 50,1   |
| Fe ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | 5 | 519   | 448     | 266              | 195    | 841    |
| K ( $\text{g kg}^{-1}$ )    | 5 | 1,11  | 1,05    | 0,23             | 0,88   | 1,50   |
| Mg ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | 5 | 73,9  | 73,3    | 4,7              | 68     | 81,2   |
| Mn ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | 5 | 54,4  | 62      | 28,8             | 6,0    | 78,0   |
| P ( $\text{g kg}^{-1}$ )    | 5 | 2,07  | 2,09    | 0,14             | 1,86   | 2,23   |
| Sr ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | 5 | 47    | 49      | 22               | 14     | 69     |
| Zn ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | 5 | 390   | 336     | 120              | 321    | 603    |

**Figura 14.** Valores de média, mínimos e máximos em rações para cães. **(A)** Concentração dos macromelementos **(B)** e **(C)** Concentração dos microelementos e elementos traço.

**Figura (A)**

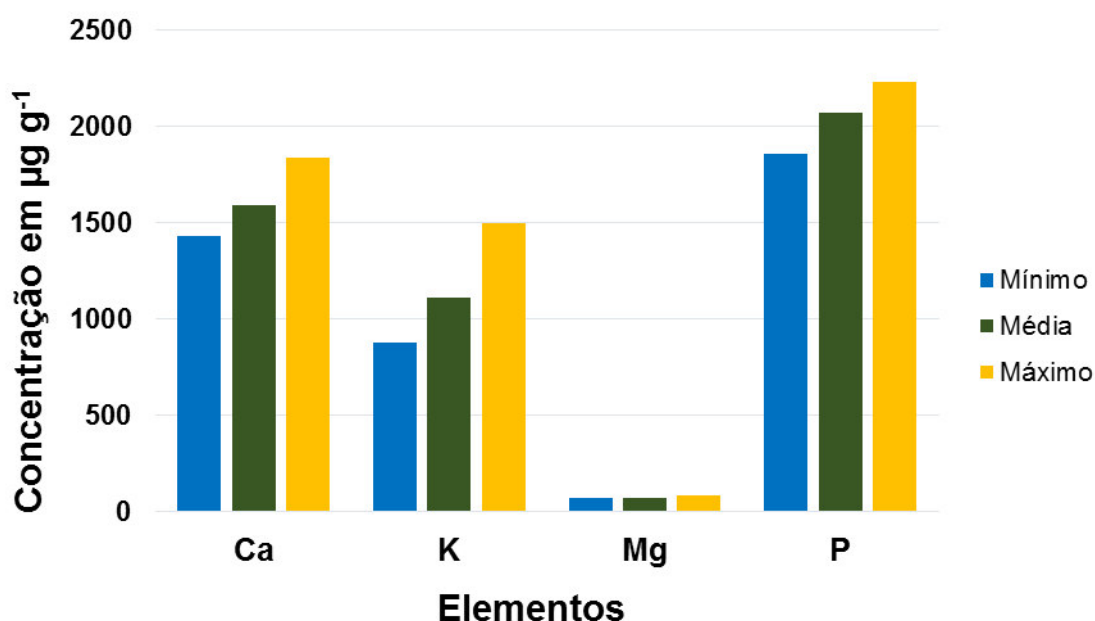


Figura (B)

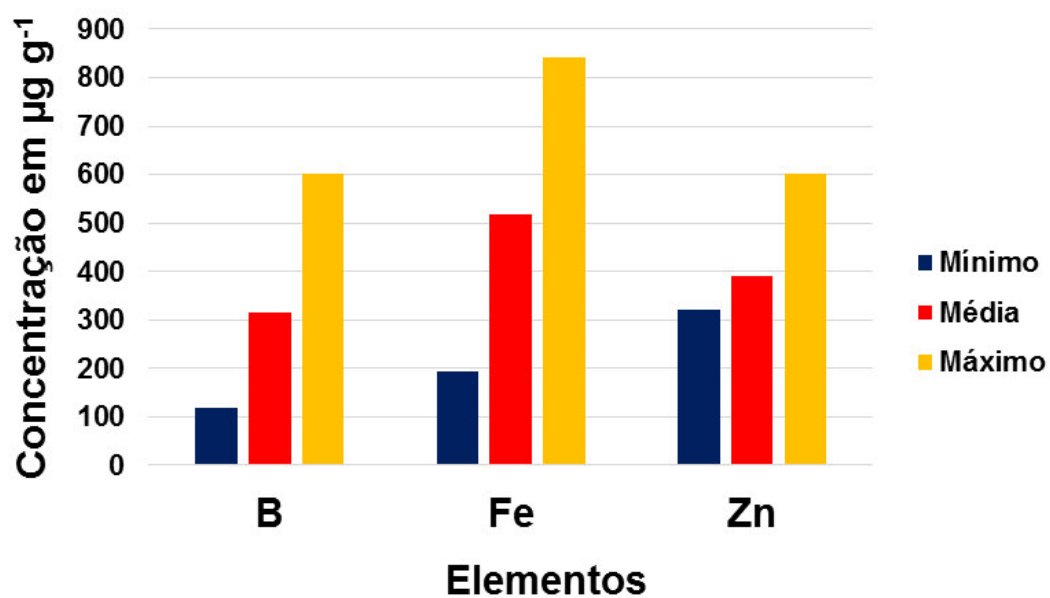
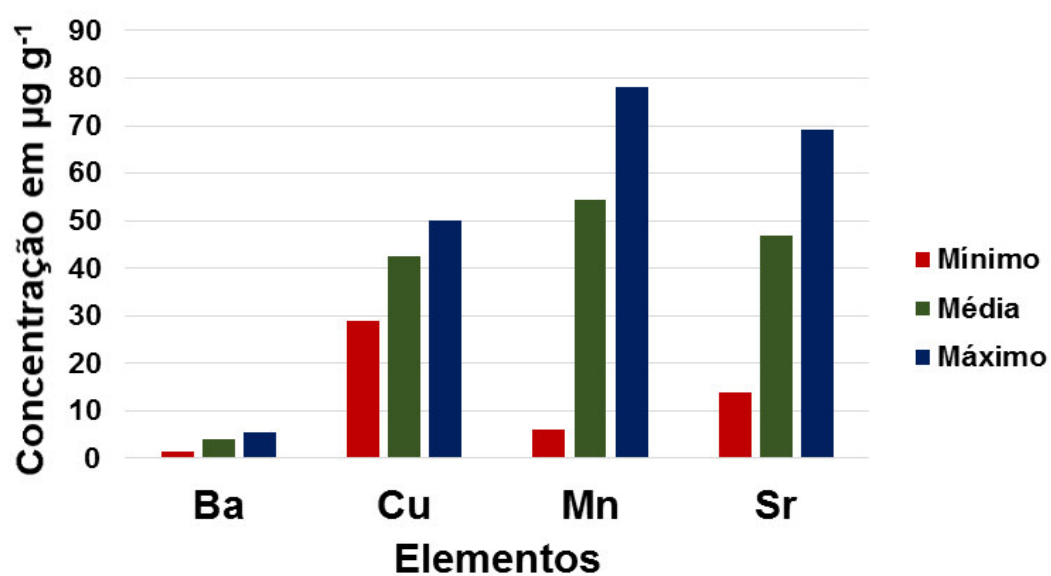


Figura (C)



**Tabela 10.** Resumo estatístico das concentrações dos elementos nas amostras de rações de gatos.

| Elementos                   | n | Média | Mediana | Desvio<br>Padrão | Mínimo | Máximo |
|-----------------------------|---|-------|---------|------------------|--------|--------|
| B ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )  | 2 | 232   | 232     | 242              | 61     | 403    |
| Ba ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | 5 | 2,08  | 2,23    | 0,65             | 1,17   | 2,91   |
| Ca ( $\text{g kg}^{-1}$ )   | 5 | 1,81  | 1,86    | 0,12             | 1,68   | 1,95   |
| Cu ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | 5 | 39,3  | 55,2    | 24,34            | 11,5   | 59,2   |
| Fe ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | 5 | 440   | 366     | 454              | 77     | 1220   |
| K ( $\text{g kg}^{-1}$ )    | 5 | 1,21  | 1,02    | 0,36             | 0,89   | 1,7    |
| Mg ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | 5 | 77,3  | 78,2    | 6,8              | 69,5   | 86,1   |
| Mn ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | 5 | 93,0  | 89,0    | 12,1             | 80,0   | 109,0  |
| P ( $\text{g kg}^{-1}$ )    | 5 | 2,32  | 2,37    | 0,15             | 2,1    | 2,47   |
| Sr ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | 5 | 38    | 35      | 22               | 20     | 74     |
| Zn ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | 5 | 293   | 317     | 81,9             | 200,0  | 403,0  |

**Figura 15.** Valores de média, mínimos e máximos em rações para gatos. **(A)** Concentração dos macroelementos **(B)** e **(C)** Concentração dos microelementos e elementos traço.

**Figura (A)**

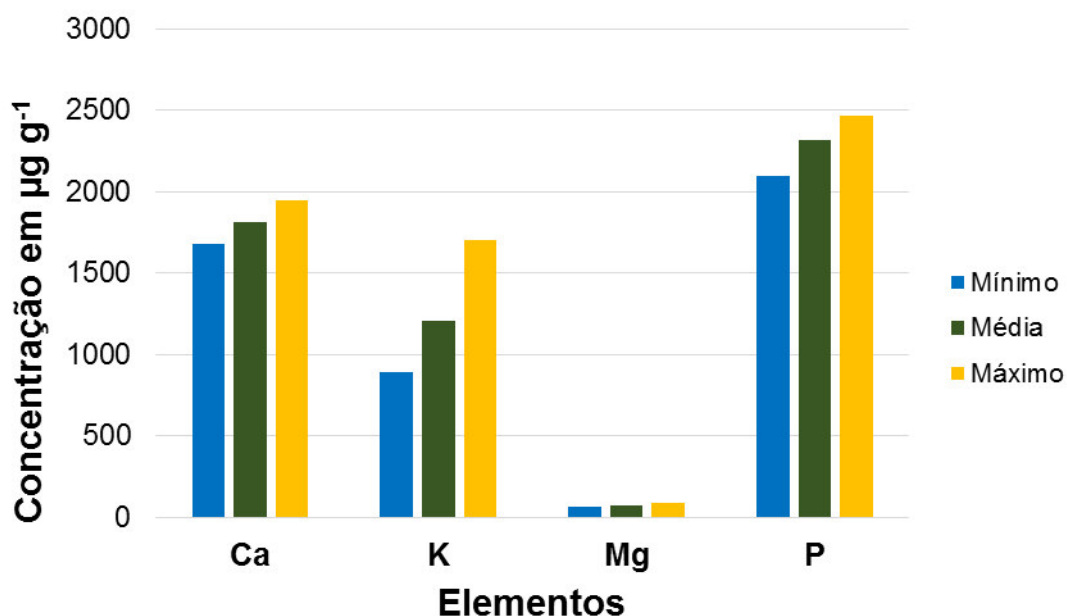


Figura (B)

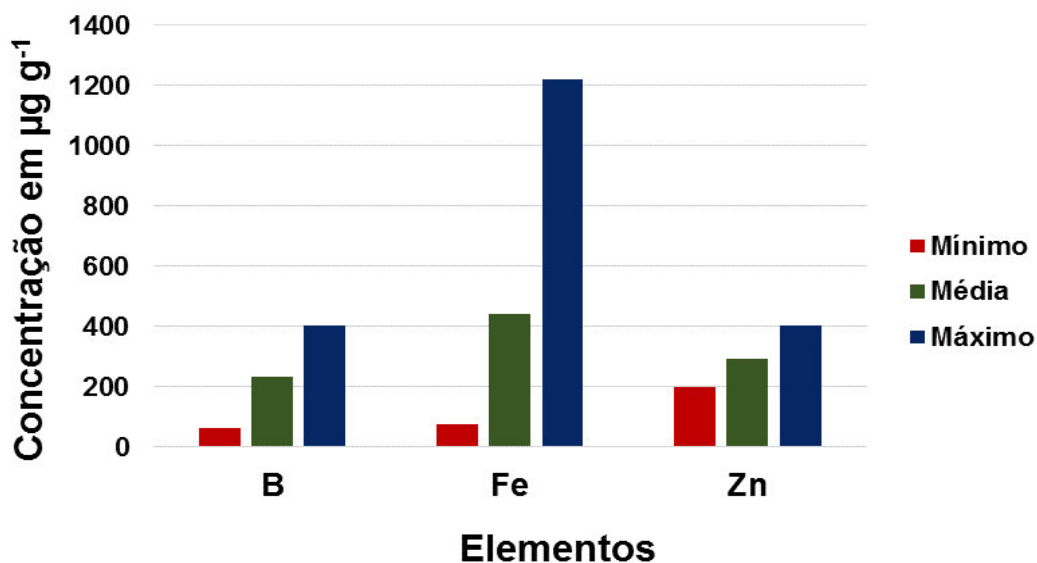
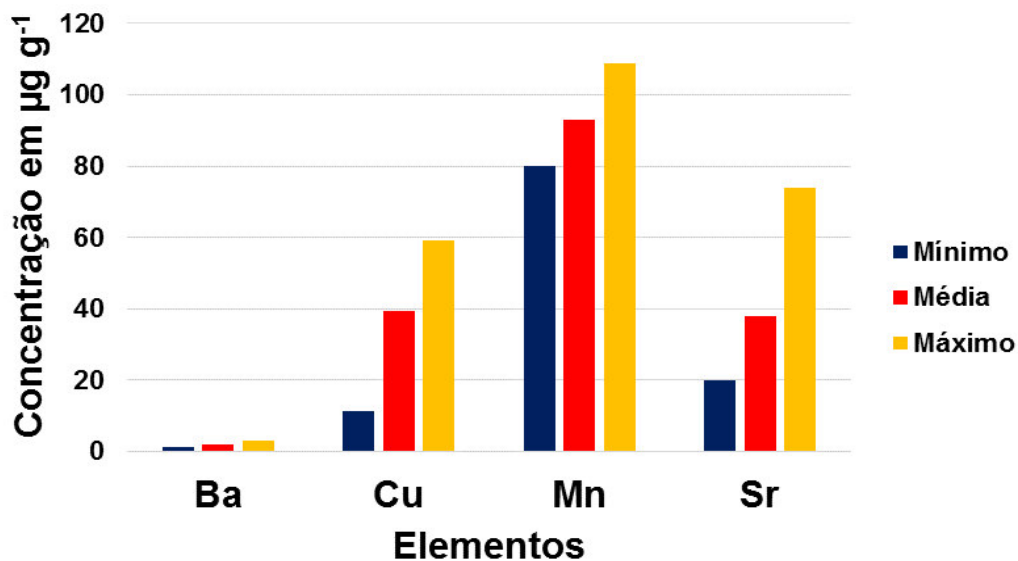


Figura (C)



Pode-se observar que tanto para as concentrações obtidas para as rações de cães (Tabela 9 e Figura 14 (A), (B) e (C)) quanto para as concentrações encontradas para rações de gatos (Tabela 10 e Figura 15 (A), (B) e (C)), o elemento que apresentou maior valor de concentração foi o P, com 2,23 e 2,47 g kg<sup>-1</sup>, respectivamente.



O P é um elemento considerado muito importante na saúde dos animais, uma vez que participa da formação do esqueleto e das membranas celulares, do metabolismo energético, participa na biossíntese de ácidos nucleicos e lipídios, além de estar envolvido na transferência de energia intracelular. O esqueleto é uma reserva de armazenamento substancial de fósforo, no qual um organismo pode recorrer em caso de deficiência, isso explica a ocorrência de doenças ósseas quando os níveis de fósforo na dieta estão abaixo ou acima do recomendado.[117],[118]

O P é o segundo elemento mineral mais abundante no organismo, estando cerca de 80-85% alocado nos dentes e ossos e os 20-15% restantes nos tecidos moles do corpo.[118]

O elemento de menor concentração obtido tanto nas rações de cães (Tabela 9 e Figura 14 (A), (B) e (C)) quanto para rações de gatos (Tabela 10 e Figura 15 (A), (B) e (C)), foi o Ba (1,46 e 1,17  $\mu\text{g g}^{-1}$  respectivamente), sendo este um microelemento que é de fundamental importância, visto que na alimentação dos animais pode provocar diversas disfunções no organismo, como o aumento da pressão arterial (hipertensão) e um mal funcionamento dos rins e do coração quando em excesso ou até mesmo quando abaixo do recomendado.[118]

### **3. CONCLUSÃO**

O planejamento simultâneo possibilitou a otimização das condições de digestão do bloco digestor em sistema fechado para a determinação multielementar de Al, B, Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, P, Sr e Zn por ICP OES.

O uso da técnica de ICP OES possibilitou a escolha de linhas analíticas livres de interferências espectrais na determinação dos macroelementos, microelementos e elementos traço.

O método otimizado mostrou-se simples, eficiente, rápido e exato para a determinação de macroelementos, microelementos e elementos traço em rações de cães e gatos empregando ICP OES.

Dentre os elementos determinados, a legislação do MAPA e da AAFCO estabelece apenas limites de máximos e mínimos para os elementos Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, P e Zn.

O Ca e o P apresentaram concentrações conforme com a legislação do MAPA, porém as concentrações obtidas para estes elementos ficaram abaixo do mínimo permitido pela AAFCO. O Cu, Fe, Mn e Zn apresentaram concentrações dentro da faixa permitida pela AAFCO. Não houve comparação com o MAPA, pois este não fornece valores para estes elementos. O K e o Mg apresentaram concentrações abaixo do mínimo permitido pela AAFCO.

#### **4. DETERMINAÇÃO DE CROMO E COBALTO EM AMOSTRAS DE RAÇÕES ÚMIDAS PARA CÃES E GATOS USANDO ANÁLISE DIRETA DE SÓLIDOS E DETECÇÃO POR HR-CS GF AAS.**

##### **4.1. OBJETIVOS**

###### **4.1.1. Objetivo geral**

- Otimizar métodos analíticos para determinar cobalto e cromo em rações de cães e gatos úmidas empregando análise direta de sólidos e detecção por espectrometria de absorção atômica com fonte contínua de alta resolução e atomização eletrotérmica em forno de grafite (HR-CS SS-GF AAS).

###### **4.1.2. Objetivos específicos**

- Estabelecer as condições de compromisso das temperaturas de pirólise e de atomização para o Cr e Co nas amostras de rações úmidas de cães e gatos e nas soluções aquosas;
- Caracterizar os parâmetros de mérito dos métodos analíticos propostos;
- Aplicar os métodos analíticos otimizados em amostras comerciais de rações úmidas (sachês e enlatadas) de cães e gatos.

##### **4.2. Parte experimental**

###### **4.2.1. Reagentes e Soluções**

Os reagentes foram de grau analítico. O ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) 65% ( $\text{m m}^{-1}$ ) de qualidade suprapura (Merck, Alemanha) foi utilizado na preparação das soluções padrão, as quais foram usadas para a construção das curvas de calibração. O ácido nítrico passou por um processo de bidestilação para sua purificação. A água deionizada para o preparo das soluções foi obtida de um sistema de purificação Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA) com resistividade

de 18,2 MΩ. As vidrarias foram lavadas com  $\text{HNO}_3$  1,4 mol  $\text{L}^{-1}$  por 24 horas e enxaguadas três vezes com água deionizada antes do uso.

As soluções padrão intermediárias de 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$  utilizadas para a obtenção das soluções padrão de referência para Cr e Co, foram preparadas a partir de soluções estoque de 1000 mg  $\text{L}^{-1}$  (Titrisol, Merck). As soluções utilizadas para a construção da curva de calibração foram preparadas por diluição em série das soluções intermediárias em meio ácido com concentração final de  $\text{HNO}_3$  0,014 mol  $\text{L}^{-1}$ .

Neste trabalho, não foi usado modificador químico para os elementos, pois ambos possuem comportamento térmico estáveis em temperaturas elevadas.[42]

#### **4.2.2. Preparo das amostras de rações úmidas**

Treze amostras de rações úmidas para cães (01) e gatos (12) foram analisadas neste trabalho, em que oito das amostras foram adquiridas em supermercados da cidade de Aracaju, Sergipe, Brasil, e cinco amostras foram adquiridas em estabelecimentos comerciais de Lisboa, Portugal.

O pré-tratamento das amostras consistiu em retirá-las das embalagens (85 g) homogeneizando-as e armazenando-as em tubos de PTFE, a fim de realizar a sua secagem em liofilizador (Liofilizador, LIOTOP modelo L 101), durante um tempo de 120 horas (5 dias).

Após a liofilização, as amostras foram trituradas manualmente com o auxílio de um almofariz e pistilo de porcelana, para uma maior superfície de contato. Em seguida, para a obtenção de menores partículas e uma melhor homogeneização, essas amostras foram trituradas em moinho de bolas (Retsch PM 100) em ciclos de 15 minutos cada amostra.

O tamanho das partículas foi controlado, passando as amostras em peneira com diâmetro menor que 150  $\mu\text{m}$ . As amostras foram armazenadas em tubos do tipo falcon de 50 mL e mantidas em dessecador até o momento da análise.

As massas pesadas das amostras para análise direta de sólidos variaram de 0,040 a 0,450 mg para determinação de Cr, e de 0,017 a 0,090 mg para determinação de Co. A variação da massa se deu por um estudo de massa realizado que será mostrado posteriormente no tópico 5.1.

#### 4.3. Instrumentação

Neste trabalho, foi utilizado um espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e atomização eletrotérmica em forno de grafite (HR-CS GF AAS) modelo ContrAA 700 (Analytik Jena, Jena, Alemanha), equipado com uma lâmpada de arco curto de xenônio de alta intensidade, com uma potência nominal de 300 W, operando em modo *hot-spot* como uma fonte de radiação contínua que emite um espectro contínuo entre 190 e 900 nm, e um monocromador duplo de alta resolução com um detector de carga acoplada (CCD).[54]

Os comprimentos de onda das linhas analíticas selecionadas no equipamento de HR-CS GF AAS para a determinação de Cr e Co nas amostras de ração foram de 357,8687 nm e 240,7254 nm, respectivamente. Foi realizada a soma da absorvância do volume do pico selecionado (PVSA) e dos valores da absorvância integrada de três pixels centrais (CP)[54],[96] para avaliação e quantificação do sinal analítico em área integrada.[61]

As análises foram realizadas em tubos de grafite aquecidos transversalmente, sendo que para as medições das absorvâncias foram usadas plataformas de grafite para amostras sólidas revestidas piroliticamente (Analytik Jena, Part nº 407-A 81.025). As amostras de rações foram pesadas diretamente na plataforma de grafite usando uma micro balança M2P (Sartorius, Gottingen, Alemanha) com precisão de 0,001 mg e introduzidas no tubo de grafite por uma pinça pré-ajustada, a qual faz parte do acessório de amostragem sólida manual, modelo SSA 5 (Analytik Jena AG, Jena, Alemanha).

Os programas de aquecimento otimizados do forno de grafite para determinação de Cr e Co estão mostrados nas Tabelas 11 e 12, respectivamente. Nas medidas foi usado o gás argônio com pureza de

99,996% (White Martins, São Paulo, Brasil), com vazão de 2,0 L min<sup>-1</sup>, como gás de purga e de proteção nas etapas do programa de temperatura do forno de grafite, exceto durante a etapa de atomização, na qual o fluxo de gás foi interrompido.

**Tabela 11.** Programa de temperatura utilizado para a determinação de cromo em amostras de ração úmida para cães e gatos.

| Etapa      | Temp/°C | Rampa/°C s <sup>-1</sup> | Patamar/s | Fluxo gás    |
|------------|---------|--------------------------|-----------|--------------|
| Secagem 1  | 90      | 10                       | 20        | Máximo       |
| Secagem 2  | 130     | 10                       | 30        | Máximo       |
| Pirólise   | 1500    | 300                      | 20        | Máximo       |
| Atomização | 2500    | 3000                     | 10        | Interrompido |
| Limpeza    | 2550    | 300                      | 4         | Máximo       |

**Tabela 12.** Programa de temperatura utilizado para a determinação de cobalto em amostras de ração úmida para cães e gatos.

| Etapa      | Temp/°C | Rampa/°C s <sup>-1</sup> | Patamar/s | Fluxo gás    |
|------------|---------|--------------------------|-----------|--------------|
| Secagem 1  | 90      | 3                        | 20        | Máximo       |
| Secagem 2  | 110     | 5                        | 10        | Máximo       |
| Pirólise   | 1400    | 300                      | 45        | Máximo       |
| Atomização | 2400    | 1500                     | 9         | Interrompido |
| Limpeza    | 2550    | 500                      | 4         | Máximo       |

O espectrômetro de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e atomização eletrotérmica em forno de grafite (HR-CS GF AAS) usado neste trabalho se encontra no Laboratório de Análise de Traços do Instituto de Química (Central Analítica), da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFGRS), Campus do Vale, na Avenida Bento Gonçalves, 9500, Porto Alegre/RS, sob supervisão da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Goreti Rodrigues Vale.

#### **4.4. Controle de qualidade**

Os materiais de referência certificados (CRMs) adquiridos no Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (*National Institute of Standards and Technology*, NIST) de músculo bovino (NIST 8414), folha de tomate (NIST 1573), folha de pessegueiro (NIST 1547), folha de maçã (NIST 1515) e fígado bovino (NIST 1577 b) foram utilizados para avaliar a exatidão e precisão dos métodos analíticos propostos.

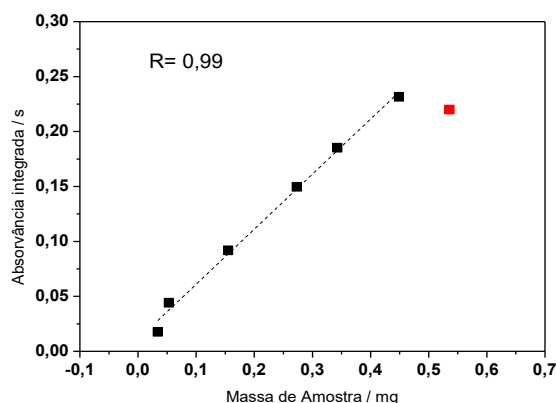
### **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Primeiramente, foi realizado um estudo da massa de amostra a ser introduzida no forno para a determinação de Cr e Co. A massa otimizada para o Cr foi de 0,250 mg de amostra e, para o Co, a massa otimizada foi de 0,030 mg de amostra para estudos subsequentes. Foram otimizadas as temperaturas de pirólise e de atomização para a amostra de ração liofilizada para cães e gatos e para soluções padrão do Cr e do Co.

#### **5.1. Estudo da massa de amostra**

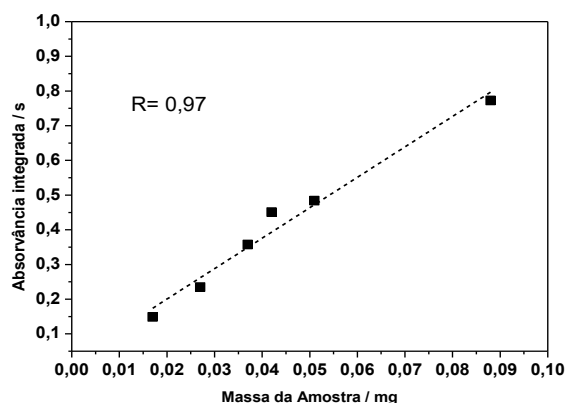
##### **5.1.1. Cromo**

Um estudo de massa foi realizado com a amostra liofilizada de ração para gato (Fabricante 3), em que a massa da amostra pesada variou de 0,040 a 0,450 mg obtendo-se os valores de absorvância integrada para cada massa. Diante disto, foi obtido um gráfico e este foi avaliado, sendo que uma massa de 0,250 mg foi estabelecida como sendo a massa para determinação de Cr nas amostras de ração, como mostra a Figura 16. Essa massa foi escolhida porque apresentou a melhor absorvância observada no estudo, bem como perfis de picos simétricos e sem nenhuma interferência espectral.

**Figura 16.** Estudo de massa de amostra para Cr.  $T_{\text{pir}}: 1500^{\circ}\text{C}$  e  $T_{\text{atm}}: 2500^{\circ}\text{C}$ 

### 5.1.2. Cobalto

Um estudo de massa foi realizado também com a amostra liofilizada de ração para gato (Fabricante 3), quando variou-se a massa entre 0,017 e 0,090 mg obteve-se valores de absorvância integrada para cada massa. Diante disto, também foi obtido um gráfico e estabelecida uma massa de 0,030 mg como sendo a massa para determinação de Co nas amostras de ração, como mostra a Figura 17.

**Figura 17.** Estudo de massa de amostra para Co.  $T_{\text{pir}}: 1400^{\circ}\text{C}$  e  $T_{\text{atm}}: 2400^{\circ}\text{C}$ .



## 5.2. Otimização da temperatura de pirólise

As curvas de pirólise obtidas no HR-CS GF AAS foram construídas a fim de avaliar o comportamento térmico do Cr e do Co, bem como a eliminação do solvente e dos concomitantes da matriz, como mostram as Figuras 18 e 19. As curvas de pirólise para ambos os elementos apresentaram perfis semelhantes, nas quais, a temperatura de pirólise para o Cr variou entre 1100 e 2000 °C, e para o Co variou entre 1000 e 1800 °C, mostrando a estabilidade térmica de ambos elementos.

Na curva de pirólise do Cr (Figura 18), pode ser observado um aumento significativo no valor da absorvância integrada na temperatura entre 1300 e 1500 °C. Na curva de pirólise do Co (Figura 19), este aumento foi observado na temperatura entre 1200 e 1400 °C. Para temperaturas superiores a estes valores, a absorvância integrada diminuiu para ambos os analitos.

Como o Cr e o Co são elementos com estabilidade térmica, conforme reporta a literatura[42], ou seja, resistem a mudanças de temperatura sem alterar seu comportamento inicial, foi previsto que os valores de absorvâncias fossem constantes em temperaturas de pirólise elevadas como entre 1300 e 1500 °C para o Cr e entre 1200 e 1400 °C para o Co.[97]

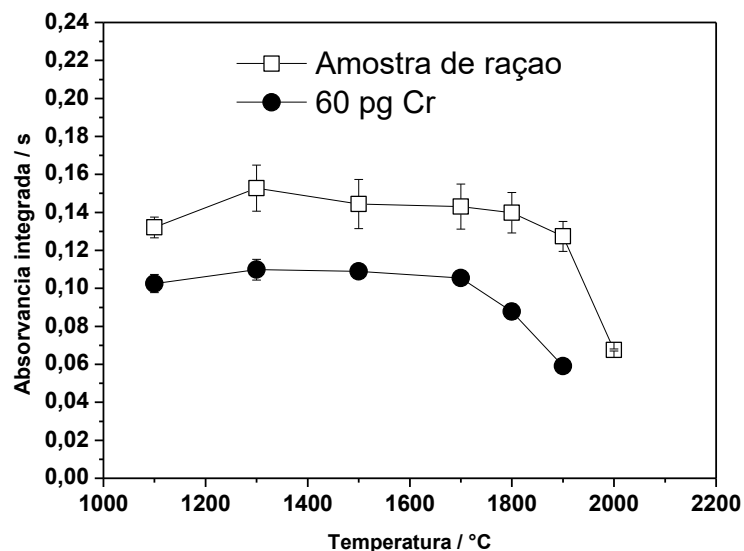
Assim, as temperaturas de pirólise foram estabelecidas para ambos os elementos com ótimos perfis de pico. A utilização de valores adequados dessas temperaturas remove eficientemente a maior parte da matriz da amostra, como também proporciona um maior tempo de vida dos tubos e das plataformas de grafite.[98]

Para as determinações de Cr e Co não foi necessário o uso de modificadores químicos, o qual tem a função de evitar a perda do analito ou a eliminação de concomitantes da matriz. Desta forma, o não uso proporcionou menores tempos de análise, visto que a etapa de adição dos modificadores na amostra no momento da análise exige uma parcela de tempo.[97]

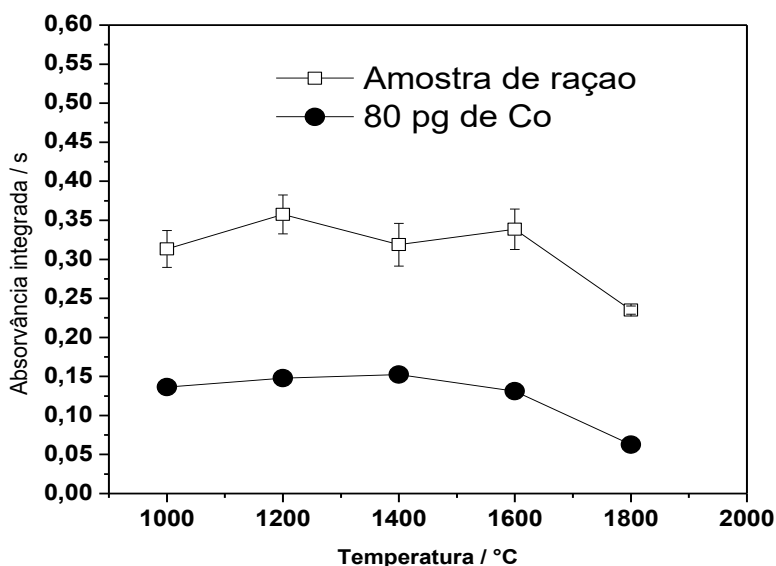
Sendo assim, para a determinação do Cr, a temperatura de pirólise otimizada foi de 1500 °C. Para a determinação de Co, a temperatura de pirólise

otimizada foi de 1400 °C, temperaturas que apresentaram os melhores valores de absorvância.

**Figura 18.** Curvas de pirólise; (●) 60 pg de Cr e (□) 0,250 mg de amostra de ração de gato a uma temperatura de atomização de 2500°C.



**Figura 19.** Curvas de pirólise; (●) 80 pg de Co e (□) 0,030 mg de amostra de ração de gato a uma temperatura de atomização de 2400 °C.

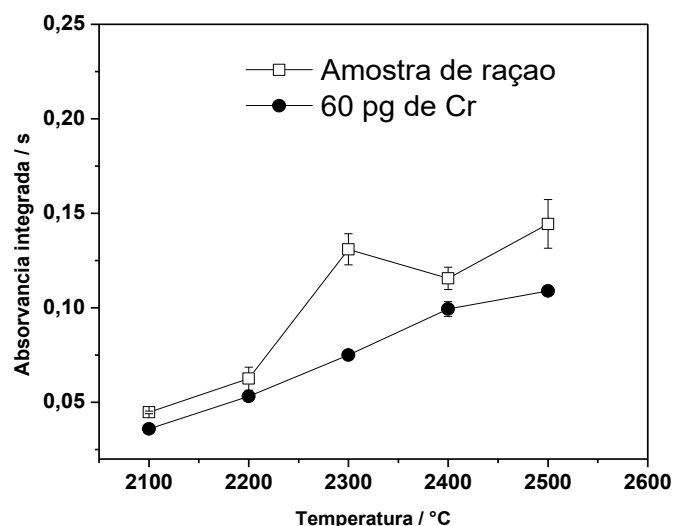


### 5.3. Otimização da temperatura de atomização

#### 5.3.1. Cromo

A temperatura de atomização foi avaliada variando-se a temperatura entre 2100 e 2500 °C para o elemento Cr, como mostra a Figura 20. Pode-se observar que as duas curvas, a da solução padrão de Cr e a da amostra de ração, se comportaram de forma semelhante: o maior sinal analítico foi obtido na temperatura de atomização de 2500 °C. Esta temperatura foi considerada ótima para a realização das análises.

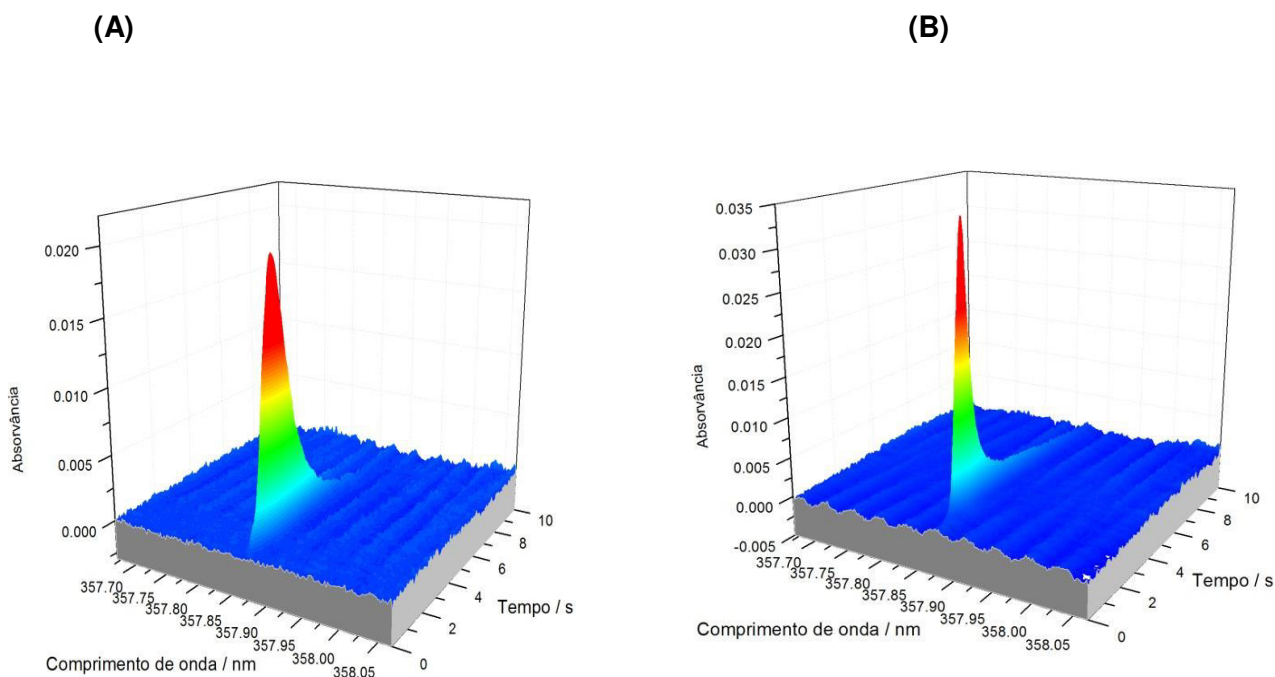
**Figura 20.** Curvas de atomização de (-●-) 60 pg de Cr e (-□-) 0,250 mg de amostra de ração de gato a uma temperatura de pirólise de 1500°C e atomização de 2500°C.



Na Figura 21, mostra-se que o perfil do pico de absorção atômica do Cr na amostra e da solução padrão contendo 60 pg de Cr apresentou comportamento ótimo nas condições de temperaturas de pirólise (1500 °C) e de atomização (2500 °C) otimizadas. Nela, há o espectro de absorção resolvido temporalmente para Cr na linha escolhida de 357,8687 nm: (A) para o Cr na solução padrão e (B) uma amostra de ração, as quais apresentaram um excelente comportamento nas condições otimizadas.

Foi possível observar na Figura 21 (A) e (B), que os sinais analíticos foram simétricos, bem como nenhuma interferência foi evidenciada, revelando que as condições otimizadas proporcionarão resultados satisfatórios na análise das demais amostras de rações úmidas.

**Figura 21.** Espectro de absorção resolvido temporalmente na vizinhança da linha analítica de Cr em 357,8687 nm: (A) massa de 60 pg de Cr e (B) 0,250 mg de amostra de ração. Temperatura de pirólise de 1500 °C e de atomização de 2500 °C.



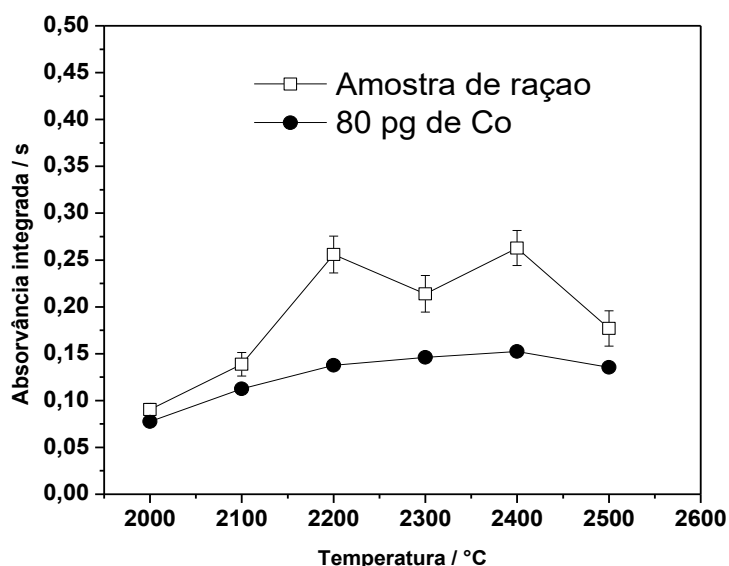
### 5.3.2. Cobalto

Para o estudo da otimização da temperatura de atomização do cobalto, foi utilizada também uma solução padrão de cobalto e uma amostra de ração úmida liofilizada.

Na Figura 22, é mostrada a avaliação da temperatura de atomização variando-a entre 2000 e 2500 °C para a determinação de Co na solução padrão e na amostra de ração. Nesta figura, também foi possível observar que as duas curvas obtidas se comportaram de forma semelhante (solução padrão de Co e amostra de ração). Desta forma, a temperatura de atomização para a

determinação de Co foi de 2400 °C com maior sinal analítico observado e melhores perfis de pico, sem a presença de interferências espectrais.

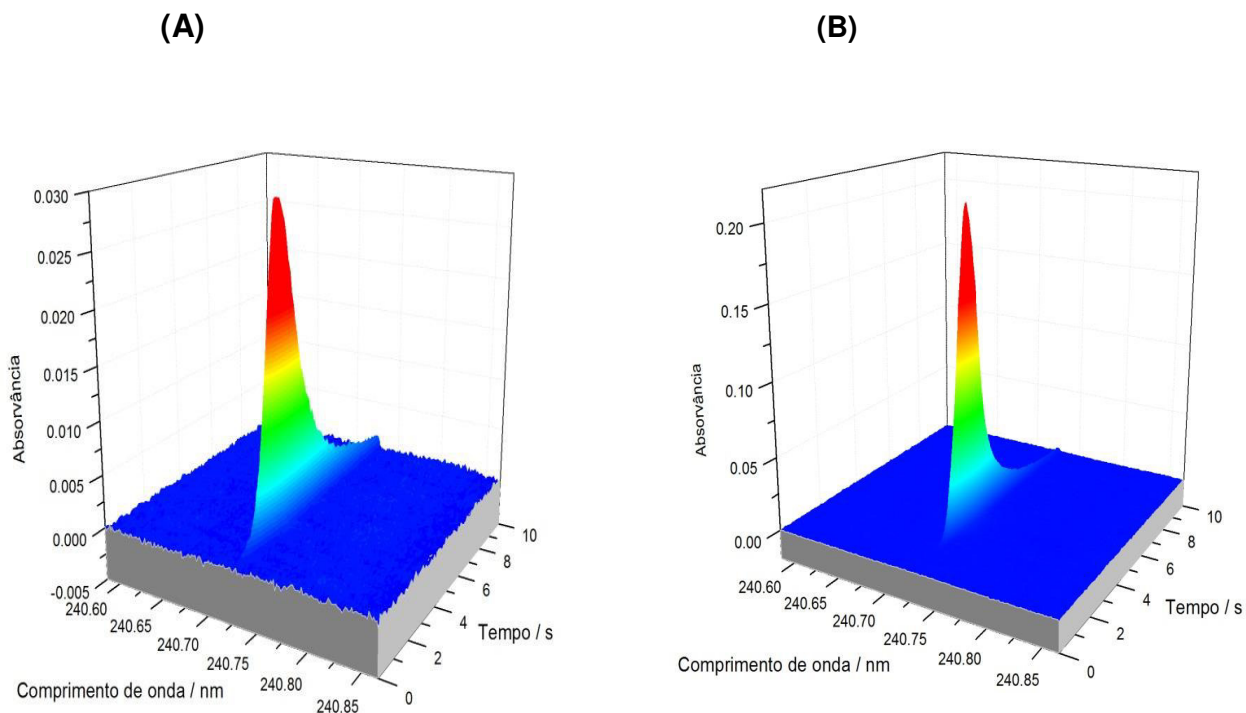
**Figura 22.** Curvas de atomização de (-●-) 80 pg de Co e (-□-) 0,030 mg de amostra de ração de gato. Temperatura de pirólise de 1400°C e de atomização de 2400 °C.



A Figura 23 mostra o espectro resolvido temporalmente nas vizinhanças da linha de absorção atômica no comprimento de onda em 240,7254 nm para a determinação de Co obtido pela introdução de (A) massa 80 pg de Co e (B) uma amostra de ração nas condições de temperaturas de pirólise (1400 °C) e atomização (2400 °C) otimizadas.

Pode-se perceber, nestas Figuras 23 (A) e (B), que os perfis de picos de absorção atômica obtidos na massa de 80 pg e na amostra de ração apresentaram comportamento semelhantes, com sinais simétricos e livres de interferências. Logo, as temperaturas estabelecidas foram adequadas para a determinação de cobalto nas amostras de rações de animais de estimação.

**Figura 23.** Espectro de absorção do Co em 240,7254 nm resolvido temporalmente na vizinhança da linha analítica: (A) massa de 80 pg de Co e (B) massa de 0,030 mg da amostra de ração úmida liofilizada. Temperatura de pirólise de 1400 °C e de atomização de 2400 °C:



#### 5.4. Parâmetros de mérito do método analítico para a determinação de Cr e Co

Após os estudos de otimização dos programas de temperaturas do forno de grafite, foram estabelecidos os parâmetros de mérito do método analítico para a determinação de Cr e Co em amostras de rações úmidas por HR-CS GF AAS.

Na construção da curva de calibração aquosa do Cr, foram usadas a solução branco e oito padrões com concentrações de 3; 6; 12; 15; 25; 30; 40 e 45  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Para a curva de calibração do Co, foram utilizadas a solução branco e seis soluções padrão de concentração de 0,4; 0,8; 1,6; 3,0; 4,0 e 5,0  $\mu\text{g L}^{-1}$ , levando em consideração que o volume injetado foi de 10  $\mu\text{L}$ . As

determinações foram realizadas em triplicata para cada ponto das curvas de calibração.

Os valores de limite de detecção (LoD) e limite de quantificação (LoQ), foram obtidos conforme recomendado pela União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC)[100], os quais se baseiam nas Equações 6 e 7, respectivamente.

$$\text{LoD} = \frac{3\sigma}{S} \quad \text{Equação 6}$$

$$\text{LoQ} = \frac{10\sigma}{S} \quad \text{Equação 7}$$

em que,  $\sigma$  é o desvio padrão de dez medidas do branco e  $S$  é a inclinação da curva de calibração. Na medida do branco para ser usado no LoD e LoQ, foi usado o conceito de “massa zero”, [108] expondo a plataforma sem amostra e sem modificador dentro do forno, a qual foi submetida aos programas de temperatura do forno de grafite (Tabelas 11 e 12). [104]

Nas determinações de Co e Cr, os valores de LoD foram de 0,01 e 0,05  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente. Os valores de LoQ foram de 0,03 e 0,17  $\mu\text{g g}^{-1}$ , respectivamente.

A massa característica ( $m_0$ ), definida como sendo a massa do analito correspondente a uma absorvância integrada de 0,0044 s [54],[99], obtida para Cr, foi de 2,2 pg e para o Co foi de 2,9 pg, valores de  $m_0$  consideradas excelentes, quando comparadas com os valores verificados na literatura:[97] para o Cr a  $m_0$  foi de 4 pg na linha medida (357,8687 nm) e, para o Co, foi de 7 pg (240,7254 nm), sendo as massas obtidas no presente trabalho menores que as massas informadas na literatura.

Esta melhora nas  $m_0$  provavelmente está relacionada ao não uso de modificadores químicos durante as medidas, uma vez que os modificadores podem degradar a razão sinal/ruído, diminuindo os LoD's e LoQ's.[97] Vale ressaltar também que, quanto menor for a  $m_0$ , mais sensível é considerado o método[54], evidenciando que os métodos propostos foram sensíveis. Esta

sensibilidade pode também ser atribuída à ausência de qualquer diluição na técnica de SS.[67]

As equações de regressão linear, os coeficientes de correlação (R), LoD, LoQ e as massas características ( $m_0$ ) para o Cr e para o Co estão apresentados na Tabela 13.

**Tabela 13.** Parâmetros de mérito na determinação de Cr e Co em ração de cães e gatos por SS-HR-CS GF AAS.

| Parâmetros                    | Cromo                          | Cobalto                        |
|-------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| Regressão linear              | $A_{int} = 0,00176 x + 0,0048$ | $A_{int} = 0,00146 x + 0,0008$ |
| Coeficiente de correlação (R) | 0,9993                         | 0,9986                         |
| LoD ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )  | 0,01                           | 0,05                           |
| LoQ ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )  | 0,03                           | 0,17                           |
| $m_0$ (pg)                    | 2,2                            | 2,9                            |

Para o cálculo dos LoD e LoQ foi usada uma massa de amostra de 0,45 mg para Cr e de 0,09 mg para Co.

Os LoD obtidos para Cr e Co no presente trabalho são compatíveis com outros valores encontrados em trabalhos na literatura por técnicas espectroanalíticas, como mostra a Tabela 14. Desta forma, pode-se evidenciar que os métodos analíticos propostos são adequados para análise de rações de animais de estimação na determinação de Co e Cr por HR-CS GF AAS empregando análise direta de sólido.

Para o elemento Co, não foram encontrados na literatura trabalhos mencionando a determinação em rações animais. Porém, foi feita a comparação dos LoD com trabalhos em que o elemento Co foi determinado em diversas espécies de peixe, alimento que está presente na composição alimentar das rações de animais.



**Tabela 14.** Valores de LoD encontrados por diferentes técnicas na determinação de Cr e Co em ração animal.

| Cr ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | Co ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | Técnica         | Referência     |
|-----------------------------|-----------------------------|-----------------|----------------|
| 0,03                        | --                          | ICP OES         | [2]            |
| 0,058                       | --                          | FAAS            | [25]           |
| 0,01                        | 0,05                        | HR-CS SS-GF AAS | Neste trabalho |
| --                          | $5 \times 10^{-5}$          | ICP MS          | [102]          |
| --                          | 0,1                         | ICP OES         | [103]          |

ICP OES: Espectrometria de emissão óptica com plasma acoplado indutivamente// AAS: Espectrometria de absorção atômica// SS-HR-CS GF AAS: Espectrometria de absorção atômica de alta resolução com fonte contínua e forno de grafite e análise direta de sólidos

#### 5.4.1. Precisão e exatidão

A exatidão do método analítico para a determinação de Cr foi confirmada através da análise dos materiais de referência certificados de folha de tomate (CRM NIST 1573), folha de maçã (CRM NIST 1515), folha de pessegueiro (CRM NIST 1547) e músculo bovino pulverizado (CRM NIST 8414). Estes CRM's apresentaram valores concordantes com os valores certificados e/ou informados. A precisão foi expressa como o desvio padrão relativo da quintuplicata ( $n=5$ ) da análise da amostra.

Para a verificação da exatidão e precisão do método na determinação de Co, foi analisado o CRM de fígado bovino (NIST 1577b), o qual apresentou valor concordante com o valor informado do material, confirmando assim que o método foi preciso e exato. A Tabela 15 mostra os resultados obtidos para a exatidão dos métodos analíticos e a aplicação do teste t para comparação de um valor experimental com um valor predito.

**Tabela 15.** Resultados da determinação de cromo e cobalto nos materiais de referência certificados por SS-HR- CS GF AAS e o teste t aplicado.

|                | CRM                                       | Valor certificado/<br>informado<br>( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | Valor<br>Encontrado<br>( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | Concordância<br>(%) | $t_{\text{calculado}}^{**}$ | %RSD |
|----------------|---|---|---|---------------------|-----------------------------|------|
| <b>Cromo</b>   | Folha de tomate<br>(NIST 1573)            | $4,5 \pm 0,5$   | $4,6 \pm 0,4$                                   | $102 \pm 9$         | 0,60                        | 8,7  |
|                | Folha de maçã<br>(NIST 1515)              | 0,3*  | $0,35 \pm 0,02$                                 | $116 \pm 7$         | 5,60                        | 5,7  |
|                | Folha de pessegueiro<br>(NIST 1547)       | 1,0*  | $1,3 \pm 0,1$                                   | $130 \pm 10$        | 6,72                        | 7,7  |
|                | Músculo bovino pulverizado (NIST<br>8414) | $0,071 \pm 0,0038$  | $0,079 \pm 0,006$                               | $111 \pm 8$         | 2,66                        | 7,6  |
| <b>Cobalto</b> | Fígado Bovino (NIST 1577b)                | 0,25*   | $0,24 \pm 0,02$                                 | $94 \pm 8$          | 1,17                        | 8,3  |

\*Valores informados. NIST 1573: Folha de Tomate// NIST 1515: Folha de Maçã// NIST 1547: Folha de Pessegueiro//NIST 8414: Músculo Bovino// NIST 1577 b: Fígado bovino. Resultados como média  $\pm$  desvio padrão (n=5) // \*\* $t_{\text{tabelado}}$  (2,776) a um nível de confiança de 95% e n=5.

Foi aplicado o teste de comparação de um valor experimental com um valor predito (teste *t-Student*) nos valores obtidos para as concentrações de Cr e Co nos CRM's através dos métodos analíticos otimizados.

Na determinação de Cr, os valores de  $t_{\text{calculado}}$  na análise do CRM de folha de tomate (NIST 1573) foi de 0,60, e para o músculo bovino pulverizado (NIST 8414) foi de 2,66. Estes valores foram menores que o  $t_{\text{tabelado}}$  (2,776;  $n=5$ ) para um nível de confiança de 95%, evidenciando que não há diferença significativa entre os valores experimentais e os valores preditos dos CRM's.

Os demais CRM's, como os de folhas de maçã ( $t_{\text{calculado}} = 5,60$ ) e de pessegueiro ( $t_{\text{calculado}} = 6,72$ ), mostraram que os valores obtidos apresentaram uma diferença significativa entre os valores encontrados e os valores informados para um nível de confiança de 95%. Este fato é declarado no documento certificado fornecido pelo NIST, em que provavelmente a homogeneidade deste elemento na amostra foi comprometida para as microanálises realizadas (massas em quantidade pequena).

O valor de  $t_{\text{calculado}}$  para comparação da concentração de Co na análise do CRM de fígado bovino (NIST 1577b) foi de 1,17, sendo este valor menor que o valor de  $t_{\text{tabelado}}$  (2,776;  $n=5$ ) para um nível de confiança de 95%. Logo, evidencia-se no método otimizado para concentração de Co que não existe diferença significativa entre o valor experimental e o valor informado do CRM.

A precisão dos resultados expressos como desvio padrão relativo (%RSD) na determinação de Cr foi obtida realizando-se a análise em quintuplicata de cada material. Os valores encontrados de %RSD para os CRM's de folha de tomate (NIST 1573), folha de maçã (NIST 1515), folha de pessegueiro (NIST 1547) e músculo bovino pulverizado (NIST 8414) foram de 8,7%, 5,7%, 7,7% e 7,6 %, respectivamente. Estes valores são aceitáveis para a análise direta de sólidos, que permite análises com valores de RSD <20%.[67]

A determinação da precisão dos resultados obtidos para Co também foi expressa como RSD, em que foi avaliado através da análise em quintuplicata do CRM de fígado bovino (NIST 1577b), o qual apresentou um valor de 8,3%, sendo este também um valor aceitável para a análise direta de sólidos que é de <20%.[67]

Portanto, pode-se afirmar que a concentração do Co apresentou uma melhor homogeneidade no material de fígado bovino quando comparada com a concentração do Cr nos CRM's de folhas de maçã e de pessegueiro.

Os valores de concordância para os CRM's analisados na determinação de cromo e cobalto estão compreendidos na faixa permitida quantitativa, que é entre 80 e 120%, exceto para o CRM de folha de pessegueiro (NIST 1547) que apresentou concordância acima dessa faixa quantitativa, fato que já é declarado no documento fornecido pelo NIST.

### **5.5. Aplicação dos métodos**

Treze amostras de rações úmidas (enlatadas e sachês) destinadas ao consumo de cães e gatos foram analisadas através dos dois métodos analíticos otimizados na determinação de Cr e Co por HR-CS SS-GF AAS. Destas, oito amostras foram obtidas em supermercados da cidade de Aracaju, Sergipe, Brasil, e as demais amostras, foram adquiridas em um supermercado da cidade de Lisboa, Província de Lisboa, Portugal. Os resultados estão na Tabela 16.

**Tabela 16.** Resultados das concentrações obtidas para Cr e Co em amostras de ração úmida empregando os métodos propostos.

| Fabricante           | Origem   | Sabor / Embalagem                    | Co ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) | Cr ( $\mu\text{g g}^{-1}$ ) |
|----------------------|----------|--------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| FB 1 <sub>gato</sub> | Brasil   | Truta e espinafre ao molho/ enlatada | $5,91 \pm 1,20$             | $0,40 \pm 0,04$             |
| FB 2 <sub>gato</sub> | Portugal | Mousse de salmão/ enlatada           | $6,30 \pm 0,55$             | $0,30 \pm 0,02$             |
| FB 1 <sub>gato</sub> | Brasil   | Salmão ao molho/ enlatada            | $4,15 \pm 0,69$             | $0,17 \pm 0,01$             |
| FB 2 <sub>gato</sub> | Portugal | Mousse de carne de vaca/ enlatada    | $< 0,17$                    | $0,40 \pm 0,03$             |
| FB 2 <sub>gato</sub> | Portugal | Mousse de vitela / enlatada          | $12,57 \pm 1,11$            | $0,23 \pm 0,02$             |
| FB 1 <sub>gato</sub> | Brasil   | Frango e cenoura ao molho/ enlatada  | $1,83 \pm 0,20$             | $0,18 \pm 0,01$             |
| FB 2 <sub>gato</sub> | Portugal | Frutos do mar (seleção)/ enlatada    | $1,09 \pm 0,23$             | $0,35 \pm 0,03$             |
| FB 2 <sub>gato</sub> | Portugal | Mousse de frango / enlatada          | $8,97 \pm 0,98$             | $0,45 \pm 0,03$             |
| FB 3 <sub>gato</sub> | Brasil   | Frango para filhotes/ sachê          | $5,98 \pm 0,43$             | $0,36 \pm 0,02$             |
| FB 3 <sub>gato</sub> | Brasil   | Carne / sachê                        | $6,59 \pm 0,99$             | $0,35 \pm 0,03$             |
| FB 3 <sub>gato</sub> | Brasil   | Cordeiro/ sachê                      | $8,51 \pm 1,98$             | $0,59 \pm 0,06$             |
| FB 4 <sub>cão</sub>  | Brasil   | Carne/ sachê                         | $6,00 \pm 0,91$             | $0,41 \pm 0,03$             |
| FB 3 <sub>gato</sub> | Brasil   | Peixe/ sachê                         | $3,10 \pm 0,45$             | $0,54 \pm 0,05$             |

\*Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão (n=5) // FB-fabricante.

Em nosso trabalho, as concentrações encontradas de Cr variaram entre  $0,17 \pm 0,01$  e  $0,59 \pm 0,06 \mu\text{g g}^{-1}$  nas amostras de rações úmidas liofilizadas. O valor médio de Cr nas amostras de rações úmidas foram de  $0,36 \pm 0,13 \mu\text{g g}^{-1}$  ( $n=13$ ). Enquanto, no estudo realizado por Duran *et al* (2010)[25] foram encontradas concentrações variando de  $1,58 \pm 0,18$  e  $2,43 \pm 0,26 \mu\text{g g}^{-1}$ . Logo, pode-se observar que os valores encontrados neste trabalho são menores que os reportados por Duran *et al*. (2010)[25].

Não há limite estabelecido nas legislações Americana (AAFCO) e brasileira (MAPA) para a concentração de Cr em rações para animais de estimação. Entretanto, o Cr juntamente com outros metais fazem parte de um grupo de elementos que há alguns anos eram considerados tóxicos e hoje fazem parte do grupo dos elementos traço nutricionais.[2],[26],[102]

Quando encontrado no estado de oxidação +3, o Cr é um elemento essencial para a saúde, pois desempenha um papel importante na gestão do peso para os animais, além de participar na regulação da glicemia (nível de glicose no sangue) e no metabolismo da glicose (ligação da insulina às células), embora, em concentrações excessivas, torna-se tóxico. Os sinais de intoxicação pelo Cr são a insuficiência renal, dermatites ocupacionais e o câncer pulmonar. As fontes mais comuns de cromo alimentar são as leveduras.[2],[26],[102]

De acordo com a Ultrateck Laboratories Inc.[101], a ingestão diária de Cr é de 50-200  $\mu\text{g}$ , sendo necessário o consumo médio de aproximadamente 140-550 g das amostras para atingir este limite de ingestão diária mencionado, considerando uma concentração média de Cr nas rações de  $0,36 \mu\text{g g}^{-1}$ . [25]

Na determinação de Co nas treze amostras de rações de animais de estimação, foram obtidas concentrações que variaram entre  $< 0,17$  e  $12,57 \pm 1,11 \mu\text{g g}^{-1}$ , como mostrado na Tabela 16. O valor médio de Co nas amostras de rações úmidas foi de  $5,92 \pm 3,19 \mu\text{g g}^{-1}$  ( $n=12$ ).

No estudo realizado por Medeiros *et al* (2012)[102] em amostras de peixes, alimento presente na composição das rações dos animais utilizadas neste trabalho, foram encontrados valores que variaram entre  $0,06 \pm 0,02$  e  $0,37 \pm 0,04 \mu\text{g g}^{-1}$  para concentrações de Co por ICP OES. Os valores de

concentrações encontradas em nosso trabalho encontra-se entre 16 a 99 vezes maiores que os valores encontrados por Medeiros *et. al* (2012)[102].

Tanto a Legislação Brasileira (MAPA) como a Legislação Americana (AAFCO) não informam os limites mínimos e máximos permitidos para Co na composição dos alimentos.

Porém, o Co é um elemento essencial tanto para os animais quanto para os humanos, em razão de ser um componente da cianocobalamina (vitamina do complexo B12), portanto, um fator necessário para a formação dos glóbulos vermelhos do sangue. Em altas concentrações, torna-se um metal tóxico que pode induzir a eritropoiese (formação de glóbulos vermelhos) e a inibição da captação do iodo pela tireoide, ocasionando o bócio, por outro lado, sua deficiência está associada à anemia, redução do apetite e pelos ásperos.[26],[102]

## 6. CONCLUSÃO

O uso da HR-CS SS-GF AAS mostrou-se uma ferramenta analítica eficiente na obtenção de um procedimento de triagem rápida e confiável para a determinação de Co e Cr em rações úmidas destinadas a cães e gatos.

As otimizações das condições dos programas de temperaturas do forno de grafite para as determinações de Cr e Co foram realizadas, nas quais as temperaturas de pirólise estabelecidas possibilitaram estabilidade dos elementos determinados, bem como a eliminação da matriz orgânica presente sem o uso de modificadores químicos.

Os valores obtidos dos LoD e LoQ foram compatíveis com os encontrados na literatura para outras técnicas espectroanalíticas.

Os valores encontrados de Cr e Co nas amostras de rações úmidas de cães e gatos não foram comparados por normas, visto que não há valores estabelecidos pela legislação de mínimos e máximos permitidos nas agências reguladoras usadas neste trabalho.

## **7. DETERMINAÇÃO DE Zn EM RAÇÕES SECAS DE CÃES E GATOS USANDO A ESPECTROMETRIA DE FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X POR ENERGIA DISPERSIVA.**

### **7.1. OBJETIVOS**

#### **7.1.1. Objetivo Geral**

- Determinar as concentrações de Zn em rações secas para cães e gatos usando a espectrometria de fluorescência de raios X por energia dispersiva (EDXRF).

#### **7.1.2. Objetivos Específicos**

- Estabelecer um método analítico para a determinação de Zn em amostras de rações secas de cães e gatos por EDXRF;
- Comparar as concentrações de Zn por EDXRF com um método estabelecido por outra técnica;
- Estabelecer os parâmetros de mérito para a determinação de Zn em amostras de rações secas de cães e gatos;
- Verificar o grau de exatidão e precisão dos resultados obtidos usando testes estatísticos de significância.

### **7.2. PARTE EXPERIMENTAL**

#### **7.2.1. Materiais e métodos**

As amostras de rações secas para consumo de cães e gatos foram adquiridas em estabelecimentos comerciais da cidade de Aracaju, Sergipe. No laboratório, passaram por um processo de liofilização e trituração em almofariz e pistilo. Em seguida, para a moagem das amostras, uma massa de aproximadamente 20 gramas de cada amostra pulverizada foi submetida a um moinho de bolas planetário (modelo PM100, Retsch, Düsseldorf, Alemanha),



em um intervalo de tempo de 5 minutos, sob uma rotação de 400 rpm e armazenadas em recipiente de polipropileno e colocadas no dessecador.

### **7.2.2. Preparo das pastilhas**

Um grama das amostras pulverizadas de ração foi medido em balança analítica, e colocadas na prensa (TECLAGO PCA) sob uma pressão de 15 toneladas durante 30 segundos para a obtenção das pastilhas. Antes desta compactação, foi preparado um suporte com 2,0 gramas de ácido bórico, servindo como base para a pastilha da amostra usando o procedimento supracitado.

As pastilhas foram acondicionadas em porta amostras de plástico e armazenadas em dessecador até o momento da análise por EDXRF. Todas apresentaram aparência firme e compacta de forma a poderem ser reutilizadas posteriormente. As pastilhas com materiais de referência certificados foram tratadas conforme o procedimento estabelecido para as amostras de rações de animais de estimação.[56]

### **7.2.3. Quantificação de zinco em amostras de rações de animais de estimação**

A determinação do zinco foi feita empregando um espectrômetro de fluorescência de raios X por energia dispersiva (modelo EDX-720HS, da Shimadzu Corporation Instrumentos Analíticos Divisão Quioto, Japão), que utiliza tubo gerador de raios X de ródio, com voltagem de 5 a 50 kV, corrente de 1 a 1000  $\mu\text{A}$  e um detector de estado sólido de Si (Li) resfriado com nitrogênio líquido. Permite medidas na faixa do  $^{11}\text{Na}$  ao  $^{92}\text{U}$ . Este equipamento encontra-se instalado no Laboratório Multiusuários I, no Departamento de Química, sob a coordenação do Programa de Pós Graduação em Química representado pelo Prof. Dr Alberto Wisniewski Júnior.

Foram realizadas 4 medidas (quadruplicata) da intensidade de fluorescência de raios X de cada pastilha no modo quantitativo, utilizando a curva de calibração em atmosfera de ar. A curva de calibração do Zn foi

construída usando quatro pastilhas de materiais de referência certificados, sendo eles de folha de chá (NCS DC 73351:  $26,3 \pm 2,0 \text{ mg kg}^{-1}$ ), proteína de peixe (DORM 3:  $51,3 \pm 3,1 \text{ mg kg}^{-1}$ ), folha de pessegueiro (NIST 1547:  $17,9 \pm 0,4 \text{ mg kg}^{-1}$ ) e tecido de ostra (NIST 1566b:  $1424 \pm 46 \text{ mg kg}^{-1}$ ).

Foram realizadas análises em sete amostras de rações secas destinadas à alimentação de cães (02) e gatos (05), em que destas amostras foram preparadas três pastilhas e cada pastilha analisada em quadruplicata ( $n=4$ ).

## **8. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **8.1. Validação do método proposto**

Os parâmetros de confiabilidade avaliados para o método proposto foram: LoD, LoQ, linearidade, precisão e exatidão. O método proposto foi aplicado para a determinação de Zn em amostras de rações de cães e gatos adquiridas em supermercados e estabelecimentos da cidade de Aracaju - Sergipe.

Foram analisadas um total de sete amostras, sendo duas amostras de rações de cães e cinco amostras de rações de gatos. Todas as amostras consideradas como rações secas para consumo de animais de estimação.

### **8.2. Limite de detecção, limite de quantificação e linearidade.**

Os valores de limite de detecção (LoD) e limite de quantificação (LoQ), foram obtidos conforme recomendado pela IUPAC[100]. Para a obtenção dos valores de LoD e de LoQ, foi realizada a medida do suporte vazio por quinze vezes, conforme conceito de “massa zero”. [108]

Os dados da curva de calibração obtida estão resumidamente expostos na Tabela 17. O coeficiente de correlação obtido foi igual a 0,9999, o qual está de acordo com as normas estabelecidas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA,  $R \geq 0,99$ ) e pelo Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO,  $R \geq 0,90$ ). [120]

O parâmetro de coeficiente de correlação permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, uma vez que este valor mais próximo de uma

unidade (1,0) proporcionará menor desigualdade no conjunto de pontos experimentais e menor incerteza dos coeficientes estimados, sendo desta forma, considerada uma correlação fortíssima.[121]

**Tabela 17.** Parâmetros de mérito do método analítico para a determinação de zinco em amostras de animais de estimação por EDXRF.

| Parâmetros de mérito                      | Valores obtidos                   |
|---|-----------------------------------|
| Faixa de trabalho ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) | 17,9 - 1424                       |
| Equação da curva de calibração            | $I = 0,02414[\text{Zn}] - 0,2055$ |
| Coeficiente de correlação                 | 0,9999                            |
| LoD ( $\text{mg kg}^{-1}$ )               | 0,1                               |
| LoQ ( $\text{mg kg}^{-1}$ )               | 0,4                               |

### 8.3. Exatidão

A exatidão representa o grau de concordância entre os resultados obtidos para uma determinada amostra e um valor de referência aceito como verdadeiro ou predito.[121]

Para a avaliação da exatidão do método analítico proposto, foi realizada a comparação dos valores encontrados na determinação de Zn por EDXRF com os valores obtidos das amostras de uma análise utilizando ICP OES descrito por Costa *et al* (2013).[2]

As porcentagens dos erros relativos entre as concentrações obtidas de Zn nas rações de animais de estimação foram calculadas e comparadas por meio dos dois métodos independentes, sendo que os valores variaram entre  $\pm 10,4$  e  $17,0\%$ . Essas determinações apresentaram erros relativos menores que  $\pm 20\%$ , sendo aceitáveis para análises químicas quantitativas e análise direta de sólidos.[2],[67] Os resultados das determinações de Zn nas amostras de rações secas estão mostrados na Tabela 18.

**Tabela 18.** Resultados obtidos para as concentrações de Zn usando o método analítico por EDXRF, comparados com os resultados obtidos através do método analítico utilizando ICP OES em rações de cães e gatos.

| Rações | ICP OES**                 | EDXRF*                    | %E    |
|--------|---------------------------|---------------------------|-------|
|        | Zn (mg kg <sup>-1</sup> ) | Zn (mg kg <sup>-1</sup> ) |       |
| Cão 1  | 80,1 ± 5,0                | 72,5 ± 4,6                | -9,5  |
| Cão 2  | 185,0 ± 6,0               | 203,0 ± 12,1              | 9,7   |
| Gato 1 | 84,9 ± 1,0                | 86,2 ± 4,5                | 1,6   |
| Gato 3 | 73,5 ± 2,0                | 81,8 ± 0,4                | 11,3  |
| Gato 5 | 173,0 ± 4,0               | 186,0 ± 0,6               | 7,5   |
| Gato 6 | 62,7 ± 2,0                | 73,4 ± 6,0                | 17,0  |
| Gato 7 | 154,0 ± 3,0               | 138,0 ± 16,0              | -10,4 |

\*Média ± Intervalo de Confiança (95%) // \*\* Média ± desvio padrão // %E = [(Conc. EDXRF – Conc. ICP OES) / Conc. ICP OES] x100

Foi aplicada a análise de variância (ANOVA) aos resultados das concentrações de Zn entre os métodos independentes, para um fator único. A Tabela 19 mostra os resultados obtidos pela ANOVA.

**Tabela 19.** Resultados da ANOVA

| Fonte da variação | <i>SQ</i>              | <i>gl</i> | <i>MQ</i>              | <i>F-valor</i>          | <i>valor-P</i>          | <i>F Crítico</i> |
|-------------------|------------------------|-----------|------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------|
| Entre grupos      | 54,77                  | 1         | 54,77                  | 1,88 x 10 <sup>-2</sup> | 8,93 x 10 <sup>-1</sup> | 4,75             |
| Dentro dos grupos | 3,50 x 10 <sup>4</sup> | 12        | 2,91 x 10 <sup>3</sup> |                         |                         |                  |
| Total             | 3,50 x 10 <sup>4</sup> | 13        |                        |                         |                         |                  |

SQ: soma dos quadrados // gl: graus de liberdade // MQ = média dos quadrados

Desta forma, foi possível observar, na Tabela 19, que o  $F_{\text{valor}}$  obtido não excedeu o valor de  $F_{\text{crítico}}$ , mostrando que não há diferença significativa entre a variância dos resultados das concentrações de Zn obtidos para um nível de confiança de 95% para os dois métodos independentes. Pode-se observar também que o  $P_{\text{valor}}$  foi igual a 0,089, sendo maior que o valor de 0,05 para um nível de 95% de confiança.

Nos valores das concentrações médias de Zn obtidas nos métodos independentes, foi aplicado também o teste t-pareado, supondo uma hipótese nula entre elas. O valor de  $t_{\text{calculado}}$  ( $t = 0,86$ ) não excedeu o valor do  $t_{\text{tabelado}}$  (gl: 6,  $t = 2,45$ ) para nível de confiança de 95%.

A correlação de Pearson foi igual a 0,98, mostrando uma relação forte entre os resultados. Logo, não existe diferença significativa entre os valores encontrados para o método analítico proposto usando EDXRF e o método usando ICP OES.

Os resultados mostraram que o método proposto também é exato para as análises das amostras de rações de cães e gatos, além de ser um método mais rápido, simples e de baixo custo quando comparado ao método analítico usando ICP OES.

#### 8.4. Precisão

A precisão representa a variedade de resultados entre experimentos independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões sob condições estimadas. Pode ser definida através das medidas de dispersão, como o desvio padrão, desvio padrão relativo, variância e coeficiente de variação. Esta última costuma ser expressa como repetitividade e precisão intermediária dos resultados.[121]

Neste trabalho, a precisão foi expressa como desvio padrão relativo (%RSD) da concentração de Zn nas amostras, em que foi obtido por meio da medida da concentração em quadruplicata para cada amostra, sendo três pastilhas para cada tipo de ração, dando um total de doze medidas para cada amostra.

As medidas obtidas através da técnica de EDXRF são pontuais, mostrando a homogeneidade intra-amostra e inter-amostra. Nestas, foi avaliado o desvio padrão em relação ao desvio padrão intermediário, sendo este obtido através das análises das amostras realizadas em dias alternados, quando o valor encontrado não excedeu o valor crítico ( $F_{3,3} = 3,28$ ) para o nível de confiança de 95%. Os valores para as amostras analisadas são mostrados na Tabela 20.

**Tabela 20.** Valores de concentrações média, máxima, mínima, desvio padrão relativo e desvio padrão relativo intermediário obtidos para as determinações de Zn por EDXRF.

| Amostra | Média*<br>(mg kg <sup>-1</sup> ) | Mínimo – Máximo<br>(mg kg <sup>-1</sup> ) | RSD<br>(%) | RSD intermediário<br>(%) | Teste F |
|---------|----------------------------------|---|------------|--------------------------|---------|
| Cão 1   | 72,5 ± 4,6                       | 68,0 - 75,4                               | 2,55       | 3,69                     | 2,09    |
| Cão 2   | 203,0 ± 12,1                     | 195,7 - 208,6                             | 2,40       | n.d.                     | n.d.    |
| Gato1   | 86,2 ± 4,5                       | 82,4 - 90,2                               | 2,08       | 2,28                     | 1,20    |
| Gato 3  | 81,8 ± 0,4                       | 77,6 - 84,5                               | 0,20       | n.d.                     | n.d.    |
| Gato 5  | 186,0 ± 0,6                      | 185,8 - 186,3                             | 0,14       | n.d.                     | n.d.    |
| Gato 6  | 73,4 ± 6,0                       | 68,7 - 79,1                               | 3,27       | 2,98                     | 1,20    |
| Gato 7  | 138,0 ± 15,6                     | 131,5 - 146,2                             | 4,55       | 8,13                     | 3,19    |

\*Média ± intervalo de confiança (95%). // n. d. = não determinado // Valor crítico  $F_{3,3; 0,05}$ : 3,28

## 9. CONCLUSÃO

O método analítico otimizado mostrou-se simples, rápido e de baixo custo para a determinação de Zn em amostras de rações secas para cães e gatos, em forma de pastilhas, empregando a técnica de EDXRF;

O método foi avaliado, comparando-se os valores obtidos com os resultados obtidos através da digestão via úmida e detecção por ICP OES;

A técnica de EDXRF não utiliza reagentes químicos em sua análise, acarretando a não geração de resíduos no meio ambiente, colaborando dessa forma com os princípios da Química Verde. Ela fornece resultados satisfatórios para análise direta de amostra, na forma de pastilha prensada, para a determinação de zinco em amostras de rações secas de animais de estimação.

## 10. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O uso de estratégias analíticas viabilizaram a otimização dos métodos analíticos, juntamente com as técnicas de espectrometria atômica, o ICP OES, HR-CS GF AAS e EDXRF empregadas para análise das amostras de rações de cães e gatos, as quais se mostraram satisfatórias na determinação dos constituintes inorgânicos.

Foram otimizados métodos analíticos simples, eficientes, rápidos, exatos e confiáveis para a determinação de macroelementos (Ca, K, Mg e P), microelementos (Cu, Fe, Mn, Zn) e elementos traço (Al, B, Ba, Cr, Co e Sr) em rações para cães e gatos.

As amostras de rações de cães e gatos avaliadas mostraram-se adequadas para o consumo dos animais brasileiros e portugueses sem apresentação de anomalias quanto aos níveis de metais determinados em sua composição.

Dentre os elementos determinados, a legislação do MAPA e a AAFCO estabelecem apenas limites de máximos e mínimos para os elementos Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, P e Zn. Logo, é oportuno a inserção de novos elementos na lista de mínimos e máximos, como B, Ba, Cr, Co e Sr. O MAPA apresenta uma

lista muito restrita (Ca e P), sendo necessária uma nova avaliação para adição de novos elementos essenciais e não essenciais.

## **11. PERSPECTIVAS PARA O TRABALHO**

- Determinar a concentração da composição mineral de elementos traço e ultratraços em rações de cães e gatos secas e úmidas empregando a espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS);
- Realizar a biodisponibilidade dos elementos nas rações de cães e gatos;
- Realizar a análise de especiação química nas amostras de rações de cães e gatos;
- Desenvolver métodos analíticos que almejem a análise de outros tipos de rações animais.



## 12. REFERÊNCIAS

- [1]. Thompson. A. Ingredients: Where Pet Food Starts. Review, 2008.
- [2]. Costa, S.S.L.; Pereira, A.C.L.; Passos, E.A.; Alves, J.P.H.; Garcia, C.A.B.; Araujo, R.G.O.; Multivariate optimization of an analytical method for the analysis of dog and cat foods by ICP OES. *Talanta* 108 (2013) 157-164.
- [3]. Wolfarth. D.; Johann. M.; Araldi. D.; A importância de uma dieta de qualidade na alimentação de cães e gatos. XVI Seminário interinstitucional de ensino, pesquisa e extensão (2011).
- [4]. Wolfsheimer, K.J. Obesity in dogs. The Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian. *Trentonv* 16 (1994) 981-997.
- [5]. Duran, A.; Tuzen, M.; Soylak, M.; Trace element concentrations of some pet foods commercially available in Turkey. *Food and Chemical Toxicology* 48 (2010) 2833-2837.
- [6]. Carciofi. A.C.; Fontes de proteína e carboidratos para cães e gatos. *Revista Brasileira de Zootecnia* 37 (2008) 28-41.
- [7]. Noel, R.J.; Krebs, S.; Non-pet food's label design a format guide. Association of American feed control officials. (2010) 1-36.
- [8]. AAFCO- Association of American Feed Control Officials. AAFCO Official Publication. Second Edition, 2000.
- [9]. National Research Council. Nutrient requirements of dogs and cats. *Washington: National Academies*. (2006) 398.
- [10]. Saracoglu, S.; Saygi, K.O.; Uluzlu, O.D.; Tuzen, M.; Mustafa, S.; Determination of trace element contents of baby foods from Turkey. *Food Chemistry* 105 (2007) 280-285.
- [11]. Bilandžić, N.; Sedak, M.; Dokić, M.; Varenina, I.; Kolanović, B. S.; Božić, D.; Brstilo, M.; Šimić, B.; Determination of zinc concentrations in foods of animal origin, fish and shellfish from Croatia and assessment of their contribution to dietary intake. *J. Food Comp. Anal.* 35 (2014) 61-65.
- [12]. Karadas. C.; Kara. D.; Chemometric approach to evaluate trace metal concentrations in some spices and herbs. *Food Chemistry* 130 (2012) 196-202.

- [13]. Kelly, D.G.; White, S.D.; Weir, R.D.; Elemental composition of dog foods using nitric acid and simulated gastric digestions. *Food and Chemical Toxicology* 55 (2013) 568-577.
- [14]. Becques, A.; Larose, C.; Baron, C.; Niceron, C.; Féron, C.; Gouat, P.; Behaviour in order to evaluate the palatability of pet food in domestic cats. *Applied Animal Behaviour Science* (2014).
- [15]. Thompson, A.; Ingredients: Where Pet Food Starts. Topical Review. *Tropics in Companion Animal Medicine* 23 (2008).
- [16]. <http://economia.estadao.com.br/noticias/geral,mercado-pet-dribla-a-crise-economica-imp-,1673676-> acessado em 30/12/2015.
- [17]. <http://www.msn.com/ptbr/dinheiro/economia/10maioresmercadosparapetsdo-mundo/ssBBo0Wla?ocid=mailsignoutmd#image=1-> acessado em 30/12/2015.
- [18]. Dzanis, D.A.; Understanding Regulations Affecting Pet Foods. Topical Review. *Topics in Companion Animal Medicine* 23 (2008).
- [19]. <http://sindiracoes.org.br/a-producao-nacional-de-alimentos-para-caes-e-gatos-cresceu-aproximadamente-5-em-2012-alcancando-23-milhoes-de-toneladas-> acessado em 22/08/2015.
- [20]. MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria N° 3, de 22 de Janeiro de 2009.
- [21]. Meeker, D.L.; Essential Rendering: all about the animal by-products industry. *Kirby Lithographic Company, Canada* (2006) 1-302.
- [22]. [http://www.saudeanimal.com.br/artigo\\_luigi\\_nutricao020.htm](http://www.saudeanimal.com.br/artigo_luigi_nutricao020.htm) - Acessado em 22/08/2015.
- [23]. Bordin, R.A.; Alimentos para cães e gatos- Visão geral. Universidade Anhembi Morumbi, São Paulo.
- [24]. Silva, C.V.; Barros, F.; Souza, C.F.V.; Qualidade nutricional de rações secas para cães adultos comercializadas em Lajeado-RS. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial* 04 (2010) 153-160.
- [25]. Duran, A.; Tuzen, M.; Soylak, M.; Trace element concentrations of some pet foods commercially available in Turkey. *Food and Chemical Toxicology* 48 (2010) 2833-2837.
- [26]. Pereira, J.C.; Boletim do Criadouro Campo das Caviúnas. 18 (2005).

- [27]. Tuzen, M.; Soylak, M.; Determination of trace metals in canned fish marketed in Turkey. *Food Chemistry* 101 (2007) 1378-1382.
- [28]. Nacke, H.; Gonçalves, JR.; Marengoni, N.G.; Feiden, A.; Bueno, G.W.; Selzlein, C.; Retenção de metais pesados (Cu, Zn, Fe, Mn, Cd, Pb e Cr) em espécies de peixes nativos criados em tanques-rede no reservatório de Itaipu.
- [29]. Tuzen, M.; Soylak, M.; Evaluation of trace element contents in canned foods marketed from Turkey. *Food Chemistry* 102 (2007) 1089-1095.
- [30]. Filho, J.C.S.; Armelin, M.J.A.; Silva, A.G.; Determinação da Composição mineral de subprodutos agroindustriais utilizados na alimentação animal, pela técnica de ativação neutrônica. *Pesq. Agropec. Bras.* 34 (1999) 235-241.
- [31]. Altundag, H.; Tuzen, M.; Comparison of dry, wet and microwave digestion methods for the multi element determination in some dried fruit samples by ICP-OES. *Food and Chemical Toxicology* 49 (2011) 2800-2807.
- [32]. Rocha, M.A.; Biotecnologia na nutrição de cães e gatos. *Revista Brasileira de Zootecnia* 37 (2008) 42-48.
- [33]. ANFALPET – Associação Nacional dos Fabricantes de Alimentos para Animais de Estimação. *Manual do programa integrado de qualidade pet* (2011).
- [34]. E. Durduran, et al., J. Ind. Eng. Chem. (2015). <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiec.2014.12.041>
- [35]. Bakircioglu, D.; Kurtulus, Y. B.; Ucar, G.; Determination of some traces metal levels in cheese samples packaged in plastic and tin containers by ICP-OES after dry, wet and microwave digestion. *Food and Chemical Toxicology* 49 (2011) 202-207.
- [36]. Nogueira, A. R. A.; Preparo de Amostras. VIII Encontro Nacional sobre Métodos dos Laboratórios da Embrapa, 2003.
- [37]. Arruda, M. A. Z.; Santelli, R. E.; Mecanização no preparo de amostras por micro-ondas: O estado da arte. *Química Nova* 20, 6 (1997) 638-643.
- [38]. Krug, F. J.; Métodos de Preparo de Amostra: Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar. VI Workshop sobre preparo de amostras UFSM, 6ª Edição, 2006.

- [39]. Gonzalez. M. H.; Souza, G. B.; Oliveira, R. V.; Forato, L. A.; Nóbrega, J. A.; Nogueira, A. R. A.; Microwave-assisted digestion procedures for biological samples with diluted nitric acid: Identification of reaction products. *Talanta* 79 (2009) 396-401.
- [40]. Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J. & Stanley, R. C. Fundamentos da Química Analítica, Tradução da 8ª edição norte americana. São Paulo, Ed. Thomson, 2007.
- [41]. Krug, F. J.; Métodos de Preparo de Amostras: Fundamentos sobre preparo de amostras orgânicas e inorgânicas para análise elementar. 1ª Ed. Piracicaba, 2008.
- [42]. Borges, A. R.; Becker, E. M.; Dessuy, M. B.; Vale, M. G. R.; Welz, B.; Investigation of chemical modifiers for the determination of lead in fertilizers and limestone using graphite furnace atomic absorption spectrometry with Zeeman-effect background correction and slurry sampling. *Spectrochimica Acta Part B* 92 (2014) 1-8.
- [43]. Duarte, A. T.; Dessuy, M. B.; Silva, M. M.; Vale, M. G. R.; Welz, B.; Determination of cadmium and lead in plastic material from waste electronic equipment using solid sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Microchemical Journal* 96 (2010) 102-107.
- [44]. Santos, E. S.; Gama, E. M.; França, R. S.; Souza, A. S.; Matos, R. P.; Espectrometria de Fluorescência de Raios-X na determinação de espécies químicas. *Enciclopédia Biosfera*, Centro Científico conhecer, 9 (2013) 3413.
- [45]. Orecchio, S.; Amorello, D.; Raso, M.; Barreca, S.; Lino, C.; Di Gaudio, F.; Determination of trace elements in gluten-free food for celiac people by ICP-MS. *Microchemical Journal* 116 (2014) 163-172.
- [46]. Tuzen, M.; Determination of heavy metals in fish samples of the middle Black Sea (Turkey) by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Food Chemistry* 80 (2003) 119-123.
- [47]. Demirel, S.; Tuzen, M.; Saracoglu, S.; Soylak, M.; Evaluation of various digestion procedures for trace element contents of some food materials. *Journal of Hazardous Materials* 152 (2008) 1020-1026.
- [48]. Bizzi, C. A.; Flores, E. M. M.; Nóbrega, J. A.; Oliveira, J. S. S.; Schmidt, L.; Mortari, S. R.; Evaluation of a digestion procedure based on the use of diluted nitric acid solutions and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for the multielement determination of

- whole milk powder and bovine liver by ICP-based techniques. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 29 (2014) 332-338.
- [49]. Bressy, F. C.; Brito, G. B.; Barbosa, I.s.; Teixeira, L.S.G.; Korn, M.G.A.; Determination of trace element concentrations in tomato samples at different stages of maturation by ICP OES and ICP MS following microwave assisted digestion. *Microchemical Journal* 109 (2013) 145-149.
- [50]. Nunes, L. S.; Barbosa, J.T.P.; Fernandes, A. P.; Lemos, V. A.; dos Santos, W. N. L.; Korn, M. G. A.; Teixeira, L. S. G. Multi-element determination of Cu, Fe, Ni and Zn content in vegetable oils samples by high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry and microemulsion sample preparation. *Food Chemistry* 127 (2011) 780-783.
- [51]. Fernández, Z. H.; Rojas, L. A. V.; Álvarez, A. M.; Álvarez, J. R. E.; Júnior, J. A. S.; González, I. P.; González, M. R.; Macias, N. A.; Sánchez, D. L.; Torres, D. H.; Application of Cold Vapor-Atomic Absorption (CVAAS) Spectrophotometry and Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry methods for cadmium, mercury and lead analyses of fish samples. Validation of the method of CVAAS. *Food Control* 48 (2015) 37-42.
- [52]. Moraes, M. L.; Feijó, M. B. S.; Melo, F. M.; Campos, R. C.; Hauser-Davis, R.A.; Iron, Cooper and Zinc in Substitute Foods for Maternal Milk: Comparison with Infant Nutritional Requirements. *J.Braz, Chem.Soc* 20 (2009) 1724-1731.
- [53]. Krawczyk, M.; Determination of macro and trace elements in multivitamin dietary supplements by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry with slurry sampling. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 88 (2014) 377-384.
- [54]. Borges, A. R.; François, L. L.; Becker, E. M.; Vale, M. G. R.; Welz, B.; Method development for the determination of chromium and thallium in fertilizer samples using graphite furnace atomic absorption spectrometry and direct solid sample analysis. *Microchemical Journal* 119 (2015) 169-175.
- [55]. Araújo, G. C. L.; Gonzalez, M. H.; Ferreira, A. G.; Nogueira, A. R. A.; Nóbrega, J. A.; Effect of acid concentration on closed-vessel microwave-assisted digestion of plant materials. *Spectrochimica Acta Part B* 57 (2002) 2121-2132.

- [56]. Teixeira, A. P.; Quintella, C. M.; Korn, M. G. A.; Fernandes, A. P. Castro, M. T. P. O.; Determinação de Mn e Zn em arroz empregando espectrometria de fluorescência de raios x de energia dispersiva. *Química nova* 35 (2012) 1133-1136.
- [57]. Kinoshita, H.; Tanaka, N.; Jamal, M.; Kumihashi, M.; Okuzono, R.; Tsutsui, K.; Ameno, K.; Application of energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry (EDX) in a case of methomyl ingestion. *Forensic Science International* 227 (2013) 103-105.
- [58]. Bilo, F.; Lodolo, M.; Borgese, L.; Bosio, A.; Benassi, L.; Depero, L.E.; Bontempi, E.; Evaluation of heavy metals contamination from environment to food matrix by TXRF: The case of rice and rice husk. *Journal of Chemistry* (2015).
- [59]. Nomura, C. S.; da Silva, C. S.; Oliveira, P. V.; Análise direta de sólidos por espectrometria de absorção atômica com atomização em forno de grafite: Uma revisão. *Química Nova* 31 (2008) 104-113.
- [60]. Nieto, B. G.; Gismera, M. J.; Sevilla, M. T.; Procopio, J. R.; Simultaneous and direct determination of iron and nickel in biological solid samples by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Talanta* 116 (2013) 860-865.
- [61]. Dittert, I. M.; Silva, J. S. A.; Araujo, R. G. O.; Curtius, A. J.; Welz, B.; Ross, H. B.; Simultaneous determination of cobalto and vanadium in undiluted crude oil using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 25 (2010) 590-595.
- [62]. Virgilio, A.; Nóbrega, J. A.; Rêgo, J. F.; Neto, J. A. G.; Evaluation of solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry for direct determination of chromium in medicinal plants. *Spectrochimica Acta Part B* 78 (2012) 58-61.
- [63]. Lepri, F. G.; Borges, D. L.G.; Araujo, R. G. O.; Welz, B.; Wendler, F.; Krieg, M.; Ross, H. B.; Determination of heavy metals in activated charcoals and carbon black for Lyocell fiber production using direct solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption and inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Talanta* 81 (2010) 980-987.

- [64]. Fechetia, M.; Tognon, A. L.; Veiga, M. A. M. S.; Determination of chlorine in food samples via the AlCl molecule using high-resolution continuum source molecular absorption spectrometry in a graphite furnace. *Spectrochimica Acta Part B* 71-72 (2012) 98-101.
- [65]. Dittert, I. M.; Borges, D. L. G.; Welz, B.; Curtius, A. J.; Becker-Ross, H.; Determination of silver in geological samples using high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry and direct solid sampling. *Microchimica Acta* 167 (2009) 21-26.
- [66]. Borges, D. L. G.; Silva, A. F.; Curtius, A. J.; Welz, B.; Heitmann, U.; Determination of lead in coal using direct solid sampling and high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Microchimica Acta*. 154 (2006) 101-107.
- [67]. Araujo, R. G. O.; Vignola, F.; Castilho, I. N. B.; Welz, B.; Vale, M. G. R.; Smichowski, P.; Ferreira, S. L. C.; Becker-Ross, H.; Determination of silver in airborne particulate matter collected on glass fiber filters using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry and direct solid sampling. *Microchemical Journal* 109 (2013) 36-40.
- [68]. Soog, D. A.; Holler, F. J.; Nieman, T. A.; Princípios de Análise Instrumental. 5ª Ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.
- [69]. Feist, B.; Mikula, B.; Pytlakowska, K.; Puzio, B.; Buhl, F.; Determination of heavy metals by ICP OES and F-AAS after preconcentration with 2,2'-bipyridyl and erythrosine. *Journal of Hazardous Materials* 152 (2008) 1122-1129.
- [70]. Souza, M. O.; Ribeiro, M. A.; Carneiro, M. T. W. D.; Athayde, G. P. B.; Castro, E. V. R.; Silva, F. L. F.; Matos, W. O.; Ferreira, R. Q.; Evaluation and determination of chloride in crude oil based on the counterions Na, Ca, Mg, Sr and Fe, quantified via ICP-OES in the crude oil aqueous extract. *Fuel* 154 (2015) 181-187.
- [71]. Souza, S. O.; Costa, S. S. L.; Santos, D. M.; Pinto, J. S.; Garcia, C. A. B.; Alves, J. P. H.; Araujo, R. G. O.; Simultaneous determination of macronutrients, micronutrients and trace elements in mineral fertilizers by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B* 96 (2014) 1-7.

- [72]. Bruzzoniti, M. C.; Carlo, R. M.; Sarzanini, C.; Maina, R.; Tumiatti, V.; Determination of copper in liquid and solid insulation for large electrical equipment by ICP OES. Application to copper contamination assessment in power transformers. *Talanta* 99 (2012) 703-711.
- [73]. Sereshti, H.; Heravi, Y. E.; Samadi, S.; Optimized ultrasound-assisted emulsification microextraction for simultaneous trace multielement determination of heavy metals in real water samples by ICP-OES. *Talanta* 97 (2012) 235-241.
- [74]. Chaves, E. S.; Loos-Vollebregt, M. T. C.; Curtius, A. J.; Vanhaecke, F.; Determination of trace elements in biodiesel and vegetable oil by inductively coupled plasma optical emission spectrometry following alcohol dilution. *Spectrochimica Acta Part B* 66 (2011) 733-739.
- [75]. Cadore, S.; Matoso, E.; Santos, M. C.; A espectrometria Atômica e a determinação de elementos metálicos em material polimérico. *Quim. Nova* 31 (2008) 1533-1542.
- [76]. Oliveira, A. D.; Clain, A. F.; Estudo Comparativo da espectrometria de emissão atômica com fonte de plasma indutivamente acoplado com a espectrometria de emissão atômica com fonte de centelha para análise quantitativa de aço. *TECCEN* 3 (2010).
- [77]. Brenner, I. B.; Zander, A. T.; Axially and radially viewed inductively coupled plasmas- a critical review. *Spectrochimica Acta Part B* 55 (2000) 1195-1240.
- [78]. Kaplan, D. I.; Hunter, D. B.; Bertsch, P. M.; Bajt, S.; Adriano, D. C.; Application of Synchrotron X-ray Fluorescence Spectroscopy and Energy Dispersive X-ray Analysis to Identify Contaminant Metals on Groundwater Colloids. *Environ. Sci. Technol* 28 (1994) 1186-1189.
- [79]. R. Ravisankar, S. Sivakumar, A. Chandrasekaran, K. V. Kanagasabapathy, M. V. R. Prasad and K. K. Satapathy, Statistical assessment of heavy metal pollution in sediments of East Coast of Tamilnadu using Energy dispersive X-ray fluorescence spectroscopy (EDXRF). *Applied Radiation and Isotopes*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.apradiso.2015.03.018>
- [80]. Soodan, R.K.; Pakade, Y.B.; Nagpal, A.; Katnoria, J.K.; Analytical techniques for estimation of heavy metals in soil ecosystem: A tabulated review. *Talanta* 125 (2014) 405-410.



- [81]. Yildiz, S. Z.; Çevik, U.; Aralay, Y.; (E,E)S,S'-bis(2-benzimidazolymethyl) dithioglyoxime, synthesis and characterization of heterotrinnuclear complexes of and determination of their metal contents by EDXRF analysis. *Journal of Organometallic Chemistry* 693 (2008) 189-196.
- [82]. Calza, C.; Fluorescência de raios X aplicada à análise de bens culturais. *Boletim Eletrônico da ABRACOR* 1, Junho de 2010.
- [83]. Teixeira, A. P.; Quintella, C.M.; Korn, M. G. A.; Fernandes, A. P.; Castro, M. T. P. O.; Determinação de Mn e Zn em arroz empregando espectrometria de fluorescência de raios X de energia dispersiva. *Quim. Nova* 35 (2012) 1133-1136.
- [84]. Wastowski, A. D.; Rosa, G. M. R.; Cherubin, M. R.; Rigon, J. P. G.; Caracterização dos níveis de elementos químicos em solo, submetido a diferentes sistemas de uso e manejo, utilizando espectrometria de fluorescência de raios-X por energia dispersiva. *Quim. Nova* 33 (2010) 1449-1452.
- [85]. De la Calle, I.; Costas, M.; Cabaleiro, N.; Lavilla, I.; Bendicho, C.; Fast method for multielemental analysis of plants and discrimination according to the anatomical part by total reflection X-ray fluorescence spectrometry. *Food Chemistry* 138 (2013) 234-241.
- [86]. Otaka, A.; Hokura, A.; Nakai, I.; Determination of trace elements in soybean by X-ray fluorescence analysis and its application to identification of their production áreas. *Food Chemistry* 147 (2014) 318-326.
- [87]. Doyle, A.; Saavedra, A.; Tristão, M.L.B.; Aucelio, R.Q.; Determination of S, Ca, Fe, Ni and V in crude oil by energy dispersive X-ray fluorescence spectrometry using direct sampling on paper substrate. *Fuel* 162 (2015) 39-46.
- [88]. Pataca, L. C. M.; Bortoleto, G. G.; Bueno, M. I. M. S.; Determinação de Arsênio em águas contaminadas usando fluorescência de raios-x por energia dispersiva. *Quim. Nova* 28, 4 (2005) 579-582.
- [89]. Yatkin, S.; Gerboles, M.; Borowiak, A.; Evaluation of standardless EDXRF analysis for the determination of elements on PM<sub>10</sub> loaded filters. *Atmospheric Environment* 54 (2012) 568-582.

- [90]. Terra, J.; Antunes, A. M.; Bueno, M. I. M. S.; Prado, M. A.; Um método verde, rápido e simples para determinar o valor energético de farinhas e cereais matinais. *Quim. Nova* 33 (2010) 1098-1103.
- [91]. Lenardão, E. J.; Freitag, R. A.; Dabdoub, M. J.; Batista, A. C. F.; Silveira, C. C.; “Green chemistry” - Os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. *Quim. Nova* 26 (2003) 123-129.
- [92]. Lee, J.; Na, J.; Kim, J.A.; Yoon, H.O.; Effectiveness of activated carbon disk for the analysis of iodine in water samples using wavelength dispersive X-ray fluorescence spectrometry. *Chemosphere* 142 (2016) 72-76.
- [93]. Silva, F. M.; Lacerda, P. S. B.; Júnior, J. J.; Desenvolvimento sustentável e química verde. *Quim. Nova* 28 (2005) 103-110.
- [94]. An, J.; Lee, J.; Yoon, H.O.; Strategies for overcoming limitations associated with fluorine determination in solid materials by conventional wavelength dispersive X-ray fluorescence spectrometry. *Microchemical Journal* 122 (2015) 76-81.
- [95]. MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa Nº 30, de 05 de Agosto de 2009. Publicado no Diário Oficial da União de 07/08/2009, Seção 1, Página 13.
- [96]. Duarte, A. T.; Dessuy, M. B.; Vale, M. G. R.; Welz, B.; Andrade, J. B.; Sequential determination of Cd and Cr in biomass samples and their ashes using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry and direct solid sample analysis. *Talanta* 115 (2013) 55-60.
- [97]. Welz, B. Sperling, M. Atomic Absorption Spectrometry, 3<sup>rd</sup> ed., Wiley-VCH: Weinheim, 1999.
- [98]. Gómez-Nieto, B.; Gismara, M. J.; Sevilla, M. T.; Procopio, J. R.; Simultaneous and direct determination of iron and nickel in biological solid samples by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Talanta* 116 (2013) 860-865.
- [99]. Welz, B.; Becker-Ross, H.; Florek, S.; Heitmann, U.; *High-Resolution Continuum Source AAS*; Wiley-VCH: Weinheim, 2005.
- [100]. IUPAC Analytical Chemistry Division. Spectrochim. Acta B. 33 (1978) 247-269.
- [101]. Ultrateck Laboratories Inc., 2010. Disponível em: [http:// www.ultrateck.net](http://www.ultrateck.net) acessado em 20/10/2015.

- [102]. Medeiros, R. J.; dos Santos, L. M. G.; Freire, A. S.; Santelli, R. E.; Braga, A. M. C. B.; Krauss, T. M.; Jacob, S. C.; Determination of inorganic trace elements in edible marine fish from Rio de Janeiro State, Brazil. *Food Control* 23 (2012) 535-541.
- [103]. Onsanit, S.; Ke, C.; Wang, X.; Wang, KJ.; Wang, WX.; Trace elements in two marine fish cultured in fish cages in Fujian province, China. *Environmental Pollution* 158 (2010) 1334-1342.
- [104]. Zmozinski, A. V.; Llorente-Mirandes, T.; Damin, I.C.F.; López-Sánchez, J.F.; Vale, M.G.R.; Welz, B.; Silva, M.M.; Direct solid sample analysis with graphite furnace atomic absorption spectrometry- A fast and reliable screening procedure for the determination of inorganic arsenic in fish and seafood. *Talanta* 134 (2015) 224-231.
- [105]. Oliveira, H.R.; Mesko, M.F.; Vale, M.G.R.; Silveira, C.A.P.; Picoloto, R.S.; Becker, E.M.; Development of methods for the determination of cadmium and thallium in oil shale by-products with graphite furnace atomic absorption spectrometry using direct analysis. *Microchemical Journal* 116 (2014) 55-61.
- [106]. Araujo, R.G.O.; Vignola, F.; Castilho, I.N.B.; Borges, D. L.G.; Welz, B.; Vale, M. G. R.; Smichowski, P.; Ferreira, S. L.C.; Becker-Ross, H.; Determination of mercury in airborne particulate matter collected on glass fiber filters using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry and direct solid sampling. *Spectrochimica Acta Part B* 66 (2011) 378-382.
- [107]. Gunduz, S.; Akman, S.; Determination of lead in rice grains by solid sampling HR-CS GF AAS. *Food Chemistry* 141 (2013) 2634-2638.
- [108]. Kurfurst, U.; Solid Sample Analysis: Direct and Slurry Samplig Using GF-AAS and ETV-ICP, first ed., Springer, Berlin, 1998.
- [109]. Diter, I.M.; Silva, J.S.A.; Araujo, R.G.O.; Curtius, A.J.; Welz, B.; Becker-Ross, H.; Direct and simultaneous determination of Cr and Fe in crude oil using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B* 64 (2009) 537-543.
- [110]. Bizzi, C. A.; Barin, J.S.; Garcia, E.E.; Nóbrega, J.A.; Dressler, V.L.; Flores, E.M.M.; Improvement of microwave-assisted digestion of milk powder with diluted nitric acid using oxygen as auxiliary reagent. *Spectrochimica Acta Part B* 66 (2011) 394-398.

- [111]. Dantas, A.N.S.; Matos, W.O.; Gouveia, S.T.; Lopes, G.S.; The combination of infrared and microwave radiation to quantify trace elements in organic samples by ICP OES. *Talanta* 107 (2013) 292-296.
- [112]. Morte, E.S.B.; Barbosa, I.S.; Santos, E.C.; Nóbrega, J.A.; Korn, M.G.A.; Axial view inductively coupled plasma optical emission spectrometry for monitoring tin concentration in canned tomato sauce samples. *Food Chemistry* 131 (2012) 348-352.
- [113]. Castro, J.T.; Santos, E.C.; Santos, W.P.C.; Costa, L.M.; Korn, M.; Nóbrega, J.A.; Korn, M.G.A.; A Critical evaluation of digestion procedures for coffee samples using diluted nitric acid in closed vessels for inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Talanta* 78 (2009) 1378-1382.
- [114]. Ghernaout, D.; Ghernaout, B.; Naceur, M.W.; Embodying the chemical water treatment in the green chemistry- A review. *Desalination* 271 (2011) 1-10.
- [115]. Schiavo, D.; Trevizan, L.C.; Filho, E.R.P.; Nóbrega, J.A.; Evaluation of the use of multiple lines for determination of metals in water by inductively coupled plasma optical emission spectrometry with axial viewing. *Spectrochimica Acta Part B* 64 (2009) 544-548.
- [116]. Ferreira, S. L. C.; Dos Santos, W. N. L.; Bezerra, M. A.; Lemos, V. A.; Bosque-Sendra, J. M.; Use of factorial design and Doehlert matrix for multivariate optimisation of an on-line preconcentration system for lead determination by flame atomic absorption spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 375 (2003) 443-449.
- [117]. Alimentação Canina. Disponível em: <https://sites.google.com/site/racoescomposicao/home> Acessado em 27/04/2015.
- [118]. Gonçalves, L. C.; Borges, I.; Ferreira, P. D. S.; Alimentos para Gado de Leite. FEPMVZ, Belo Horizonte (2009).
- [119]. Hunt, C. D. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. Academic Press (2003) 566-574.
- [120]. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA); *Resolução RE* nº 899, de 29 de maio de 2003.
- [121]. Ribani, M.; Bottoli, C. B. G.; Collins, C. H.; Jardim, I. C. S. F.; Melo, L. F. C.; *Quim. Nova* 2004, 27, 771.
- [122]. Kira, C. S.; Maihara, V. A. *Food Chemistry* 100 (2007) 390-395.

- [123]. Brito, N. M.; Júnior, O. P. A.; Polese, L.; Santos, T. C. R.; Ribeiro, M. L.; *Pesticidas: R. Ecotoxicol. E Meio Ambiente* 2002, 12, 155.
- [124]. Sánchez, C.; Lienemann, C.P.; Todolí, J.L; Metal and metalloid determination in bioethanol through inductively coupled plasma-optical emission spectrometry. *Spectrochimica Acta Part B* 115 (2016) 16-22.
- [125]. Nunes, A.M.; Souza, R.A.; Silva, C.S.; Peixoto, R.R.A.; Vieira, M.A.; Ribeiro, A.S.; Cadore, S.; Fast determination of Fe, Mg, Mn, P and Zn in meat samples by inductively coupled plasma optical emission spectrometry after alkaline solubilization. *Journal of Food Composition and Analysis* 32 (2013) 1-5.
- [126]. Cruz, S.M.; Tirk, P.; Nora, F.M.D.; Schmidt, L.; Wiltse, H.; Bizzi, C.A.; Knapp, G.; Flores, E.M.M.; Feasibility of sulfur determination in diesel oil by inductively coupled plasma optical emission spectrometry after microwave-induced combustion using flame retardant. *Fuel* 160 (2015) 108-113.
- [127]. Cruz, S.M.; Schmidt, L.; Nora, F.M.D.; Pedrotti, M.F.; Bizzi, C.A.; Barin, J.S.; Flores, E.M.M.; Microwave-induced combustion method for the determination of trace and ultratrace element impurities in graphite samples by ICP-OES and ICP-MS. *Microchemical Journal* 123 (2015) 28-32.
- [128]. Oliveira, J.S.S.; Picoloto, R.S.; Bizzi, C.A.; Mello, P.A.; Barin, J.S.; Flores, E.M.M.; Microwave-assisted ultraviolet digestion of petroleum coke for the simultaneous determination of nickel, vanadium and sulfur by ICP-OES. *Talanta* 144 (2015) 1052-1058.
- [129]. Pereira Junior, J.B.; Dantas, K.G.F.; Evaluation of inorganic elements in cat's claw teas using ICP OES and GF AAS. *Food Chemistry* 196 (2016) 331-337.
- [130]. Nunes, A.M.N.; Sousa, R.A.; Silva, C.S.; Peixoto, R.R.A.; Vieira, M.A.; Ribeiro, A.S.; Cadore, S.; Fast determination of Fe, Mg, Mn, P and Zn in meat samples by inductively coupled plasma optical emission spectrometry after alkaline solubilization. *Journal of Food Composition and Analysis* 32 (2013) 1-5.
- [131]. Damin, I.C.F.; Silva, M.M.; Vale, M.G.R.; Welz, B.; Feasibility of using direct determination of cadmium and lead in fresh meat by electrothermal atomic absorption spectrometry for screening purposes. *Spectrochimica Acta Part B* 62 (2007) 1037-1045.